



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**STUDIUM CHOVÁNÍ BUNĚK NA
NANOSTRUKTUROVANÝCH TiO₂ POVRŠÍCH**

NANOSTRUCTURED TiO₂ AS THE SURFACE FOR THE INVESTIGATION OF CELL
BEHAVIOUR

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Poláková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

BRNO 2016

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Kateřina Poláková

ID: 171457

Ročník: 2

Akademický rok: 2015/16

NÁZEV TÉMATU:

Studium chování buněk na nanostrukturovaných TiO₂ površích

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Vypracujte literární rešerši v oblasti přípravy nanostrukturovaných a nanoporézních povrchů na bázi TiO₂ (se zaměřením na problematiku tenkých vrstev z Ti a jejich anodickou oxidací na TiO₂) a jejich využití pro biomedicínské aplikace. 2) Návrhněte a vyrobte 3D titanové nanostrukturované a nanoporézní povrchy pomocí šablony z oxidu hlinitého (AAO) a přímé potenciostatické anodické oxidace titanové vrstvy. Otestujte vliv tloušťky původní titanové vrstvy, typu substrátu, aplikovaného anodizačního potenciálu a složení elektrolytu na morfologické a strukturální vlastnosti nanostruktur. 3) Charakterizujte vzniklé nanostrukturované povrchy pomocí SEM mikroskopu a prostudujte jejich smáčivost pomocí metody měření kontaktního úhlu. 4) Otestujte a srovnajte biokompatibilitu připravených TiO₂ nanopovrchů u MG-63 buněk. 5) Dosažené výsledky vhodně prezentujte a vyhodnoťte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] SHUILIN Wu et al., Functionalized TiO₂ based nanomaterials for biomedical applications Advanced Functional Materials 24 (2014) 5464–5481.

[2] ZURUZI A.S. et al., Nanostructures TiO₂ thin films as porous cellular interfaces. Nanotechnology 17 (2006) 531-535.

Termín zadání: 8.2.2016

Termín odevzdání: 20.5.2016

Vedoucí práce: Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

Konzultant diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D., předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma „Studium chování buněk na nanostrukturovaných TiO₂ povrchích“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....
(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Zdence Fohlerové, Ph.D., za její rady a odborné připomínky a také za motivaci při zpracování výsledků i přes značné komplikace, které nastaly. Také bych jí chtěla poděkovat za pomoc při orientaci v laboratoři a zasvěcení do práce s buňkami. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia velmi podporuje.

Brno

.....

(podpis autora)

Výzkum popsáný v této diplomové práci byl realizovaný v laboratořích podpořených projektem Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů (SIX); registrační číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0072, operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

POLÁKOVÁ, K. *Studium chování buněk na nanostrukturovaných TiO₂ površích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 69 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D..

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá studiem interakce buněk na nanostrukturovaných površích z oxidu titaničitého, které jsou vytvářené pomocí elektrochemické metody zvané anodická oxidace. V teoretické části je vytvořen přehled výroby nanostrukturovaných povrchů pomocí metody anodické oxidace. Je zmíněn vliv vnějších faktorů na geometrické parametry struktur a popis metod charakterizace struktur. Dále je zpracován přehled využití pro biomedicínské aplikace a popis interakce buněk s povrchem. V praktické části je uveden postup výroby nanoporézních a nanotubulárních struktur na tenkých vrstvách titanu přímou metodou anodické oxidace, u kterých je sledován vliv vnějších faktorů. Dále je uveden postup a výroba tyčinkovitých struktur a nanoteček, vytvářených pomocí aluminové šablony (AAO), na kterých je následně provedeno studium chování buněk, které zahrnuje testy adheze, zkoumání morfologie adharovaných buněk, testy proliferace a diferenciací. Struktury jsou v rámci zkoumání interakce buněk s nanostrukturovanou vrstvou porovnávány s hladkým povrchem oxidu titaničitého.

Klíčová slova: oxid titaničitý, anodická oxidace, nanostruktury, adheze, proliferace

Abstract

This thesis deals with the study of cells on nanostructured surfaces of titanium dioxide, which are produced by the electrochemical method called anodic oxidation. The theoretical part is formed by an overview of manufacturing nanostructured surfaces using anodic oxidation method. It mentions the influence of external factors on the geometric parameters of the structure and description of methods of characterization structures. Furthermore there is processed outline of use for biomedical application and the description of interaction of the cell with surface. The practical part includes description of the production of nanoporous and nano-tubular structures made on thin films of titanium by direct method of anodic oxidation on which was studied the influence of external factors. Described a procedure and production of nanorods structures and nanodots generated using alumina template (AAO) which is subsequently carried out the study of the behavior of cells, which includes tests of adhesion, examination of morphology of cells, assays of proliferation and differentiation. Structures are under investigation of the interaction of cells with the nanostructured layer compared with the smooth surface of the titanium dioxide.

Keywords: titanium dioxide, anodic oxidation, nanostructures, adhesion, proliferation

Obsah:

Úvod.....	1
I. TEORETICKÁ ČÁST	2
1. NANOTECHNOLOGIE.....	2
2. OXID TITANIČITÝ (TiO ₂)	4
3. VÝZNAM NANOSTRUKTUROVANÝCH TiO ₂ POVRCHŮ PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE.....	5
3.1. Interakce buňky s povrchem.....	5
3.1.1. Buněčné linie využívané pro testování nanostrukturovaných povrchů.....	6
3.1.2. Adheze buněk.....	6
3.1.3. Proliferace buněk.....	8
3.2. Biomedicínské aplikace titanu.....	9
3.2.1. Náhrady tvrdých tkání.....	10
3.2.2. Ostatní využití	12
4. FUNKCIONALIZACE POVRCHŮ.....	13
4.1. Růstové faktory.....	13
4.2. Proteiny.....	13
4.3. Plasma.....	13
4.4. Modifikace pomocí UV záření	13
5. VÝROBA TiO ₂ NANOSTRUKTUR	15
5.1. Anodická oxidace	15
5.1.1. Časový průběh.....	16
5.1.2. Tvorba kompaktní vrstvy	18
5.1.3. Tvorba porózní vrstvy	18
5.1.4. Tvorba tyčinek a teček pomocí aluminové šablony	18
5.1.5. Chemický model průběhu	19
6. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ GEOMETRII STRUKTUR	22
6.1. Elektrolyty	22
6.1.1. Vodné elektrolyty.....	23
6.1.2. Organické elektrolyty.....	23
6.1.3. Vliv pH.....	24
6.2. Napětí.....	25
6.3. Čas a teplota.....	26
7. CHARAKTERIZACE POVRCHŮ	27

7.1.	Rastrovací elektronový mikroskop	27
7.2.	Měření kontaktního úhlu	28
II.	CÍLE PRÁCE	30
III.	PRAKTICKÁ ČÁST	31
8.	METODY	31
8.1.	Výroba nanostrukturovaných povrchů	31
8.1.1.	Příprava porézních a tubulárních struktur	32
8.1.2.	Příprava nanotyčinek a nanoteček	32
8.2.	Interakce buněk s nanostrukturovaným TiO ₂ povrchem	33
8.2.1.	Kultivace MG-63 buněk	33
8.2.2.	Studium adheze buněk na TiO ₂ nanostrukturách	34
8.2.3.	Fluorescenční značení aktinu	34
8.2.4.	SEM mikroskopie	34
8.2.5.	Studium proliferace buněk	35
8.2.6.	Stanovení aktivity alkalické fosfatázy	35
9.	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
9.1.	Výroba nanostrukturovaných povrchů	37
9.1.1.	Porézní struktury	37
9.1.2.	Tubulární struktury	40
9.1.3.	Tyčinkovité struktury	43
9.1.4.	Nanotečky	45
9.1.5.	Měření kontaktního úhlu vrstev TiO ₂	45
9.2.	Interakce buněk s nanostrukturovanými povrchy	47
9.2.1.	Adheze buněk na nanostrukturované povrchy	48
9.2.2.	Stanovení morfologie buněk	50
9.2.3.	Proliferace buněk na nanostrukturovaných površích	52
9.2.4.	Stanovení aktivity alkalické fosfatázy	54
9.3.	Shrnutí výsledků a rozbor vzniklých komplikací	56
	Závěr	59
IV.	POUŽITÁ LITERATURA	61
V.	SEZNAM PŘÍLOH	65

Seznam obrázků:

<i>Obr. 1-1: Rozdělení nanostruktur podle prostorového uspořádání [7]</i>	<i>3</i>
<i>Obr. 2-1: Krystalické struktury TiO₂ [10].....</i>	<i>4</i>
<i>Obr. 3-1: Interakce buňky s tubulárním nanostrukturovaným povrchem z TiO₂ [15]</i>	<i>6</i>
<i>Obr. 3-2: Různé morfologie buněk zobrazených pomocí fluorescenční mikroskopie, zelená-aktin, červená-vinculin, modrá-jádro buňky [20].....</i>	<i>7</i>
<i>Obr. 3-3: Příklad zabarvení vzorků s různou koncentrací živých buněk po MTT a XTT testu proliferace [28]</i>	<i>9</i>
<i>Obr. 3-4: Implantát zubního kořene z titanu [33]</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 5-1: Vývoj metod výroby TiO₂ nanotrubiček v čase [18].....</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 5-2: Schéma formování TiO₂ trubiček anodickou oxidací a zobrazení migrace iontů [40]</i>	<i>16</i>
<i>Obr. 5-3: Optimální proudová charakteristika průběhu anodické oxidace [8]</i>	<i>17</i>
<i>Obr. 5-4: Gradient stěny tubulárního povrchu z TiO₂ a jeho SEM charakterizace.....</i>	<i>18</i>
<i>Obr. 6-1: Vlnkové artefakty na tubulární struktuře vytvořené v elektrolytu na vodní bázi [45]</i>	<i>23</i>
<i>Obr. 6-2: Tubulární struktura vytvořená v organickém elektrolytu [46]</i>	<i>24</i>
<i>Obr. 7-1: Znázornění úhlů využívaných pro měření kontaktního úhlu [52].....</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 8-1: Použité kovové vrstvy na křemíkovém substrátu</i>	<i>31</i>
<i>Obr. 9-1: Vzorová proudová charakteristika anodické oxidace výroby porézních struktur</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 9-2: Porézní struktury vytvořené na 1 μm Ti při a) 40 V, b) 50 V, c) 60 V</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 9-3: Naprášená vrstva Ti 3x300 nm s nežádoucími zrnovými artefakty.....</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 9-4: Porézní struktury vytvořené na 3×300 nm vrstvě Ti při a) 80 V, b) 100 V, c) 120 V</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 9-5: Porézní struktury vytvořené na 200 nm Ti při a) 40 V, b) 50 V, c) 60 V</i>	<i>39</i>
<i>Obr. 9-6: Vzorová proudová charakteristika anodické oxidace při výrobě tubulárních struktur</i>	<i>40</i>
<i>Obr. 9-7: Vliv koncentrace NH₄F v elektrolytu na tubulární struktury za konstantního množství vody v elektrolytu</i>	<i>41</i>
<i>Obr. 9-8: Vliv koncentrace H₂O v elektrolytu na tubulární struktury při konstantní koncentraci NH₄F.....</i>	<i>42</i>
<i>Obr. 9-9: Schéma tvorby tyčinkovité struktury pomocí aluminové šablony [42].....</i>	<i>43</i>
<i>Obr. 9-10: Vzorový průběh anodického proudu při tvorbě nanotyčinek s využitím aluminové šablony</i>	<i>44</i>
<i>Obr. 9-11: SEM charakterizace struktury s nanotyčinkami.....</i>	<i>44</i>
<i>Obr. 9-12: SEM charakterizace struktury s nanotečkami a) pohled shora b) příčný řez</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 9-13: Kontaktní úhly vzorků bez modifikace a struktur po hodinovém ozáření UV A) struktura s nanotečkami B) struktura s nanotyčinkami C) hladký TiO₂.....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 9-14: Grafické porovnání hodnot kontaktního úhlu nemodifikovaných vzorků a vzorků vystavených UV záření</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 9-15: Buňky na nanostrukturovaných površích po 5hodinové inkubaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký TiO₂</i>	<i>48</i>

<i>Obr. 9-16: Buňky na nanostrukturovaných površích po 24hodinové inkubaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký TiO₂</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 9-17: Grafické vyjádření počtu buněk na nanostrukturovaných površích po 5 a 24 hodinách, červeně vyznačen počet slabě adherovaných buněk.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 9-18: Buňky s fluorescenčně značeným aktinem po 24hodinové kultivaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký oxid titaničitý</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 9-19: Detail buněk s fluorescenčně značeným aktinem po 24hodinové inkubaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký oxid titaničitý</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 9-20: SEM charakterizace buněk rozvětvené morfologie na TiO₂ površích A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký TiO₂.....</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 9-21: SEM charakterizace A) buňka s podlouhlou morfologií a charakteristickými výběžky lameliopodií B) filopodium (šipka)</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 9-22: Kalibrační křivka pro převod absorbance vzniklého formazanu na počet buněk u MTT testu.....</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 9-23: Grafické znázornění výsledků MTT testu v počtu buněk po 4, 24, 48 a 72 hodinách kultivace na nanostrukturách</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 9-24: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace přeměněného p-nitrofenolu</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 9-25: Grafické vyjádření aktivity alkalické fosfatázy na nanostrukturovaných površích</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 9-26: Znehodnocený povrch porézní struktury vytvářené při 100 V na původní vrstvě 3×300 nm.</i>	<i>57</i>

Úvod

Nanotechnologie procházejí v poslední době velkým vývojem, což dokazuje i rozmach jejich využití v nejrůznějších odvětvích lidské činnosti a také stále větší povědomí o těchto technologiích z řad široké veřejnosti. Skýtají totiž ohromné možnosti možných aplikací a je jisté, že o nich uslyšíme čím dál více. V posledním desetiletí je vyvíjeno enormní úsilí v oblasti základního výzkumu, zejména v oblasti nanoelektroniky. Jedním z oborů, do kterého nanotechnologie zasahují stále častěji, je oblast zdravotnictví. Biomateriály v podobě implantátů (vazy, cévní štěpy, srdeční chlopně, zubní implantáty) a zdravotnických prostředků (kardiostimulátory, biosenzory, umělé srdce atd.) jsou široce využívány k náhradě nebo obnově funkcí poškozených tkání a orgánů a tím dopomáhají ke zlepšení kvality života pacientů [1].

Celosvětová investice jen do kloubních implantátů je ročně okolo 23 miliard dolarů [2] a jen v České republice se ročně provede okolo 100 000 totálních endoprotéz kyčelního kloubu [3]. Vzhledem k rostoucímu věku dožití a životnímu stylu dnešní doby se předpokládá, že toto číslo bude rok od roku vyšší. Materiálem, který se pro kloubní náhrady využívá, je asi ze 40 % titan, a to především díky jeho unikátním vlastnostem, kterými je biokompatibilita, lepší odolnost proti korozi, trvanlivost a pevnost [1].

Interakce implantátů z čistého titanu s tkání ovšem není dostatečně kvalitní. Proto se zkoumá využití modifikace povrchu na oxid titaničitý, který lze připravit různými metodami a s rozmanitým geometrickým uspořádáním. Povrchové vlastnosti včetně složení, drsnosti, smáčivosti a textury takovýchto povrchů výrazně ovlivňují buněčné chování. Vlastnosti povrchu mají vliv na adhezi buňky, její morfologii, metabolismus, proliferaci a diferenciaci.

Cílem diplomové práce bylo seznámit se s výrobou různých typů nanostrukturovaných povrchů z oxidu titaničitého pomocí elektrochemické metody zvané anodická oxidace. Dále jsem se zaměřila na přehled využití TiO_2 struktur pro biomedicínské aplikace a vliv vnějších podmínek na výslednou geometrii struktury. Jednotlivé vlivy byly též otestovány v praktické části, která zahrnovala výrobu různých TiO_2 struktur a právě sledování vnějších parametrů a jejich vlivů na výslednou geometrii. Jednotlivé vzorky struktur byly poté charakterizovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Smáčivost nanostrukturovaných povrchů připravených pro sledování interakce buněk s nimi, byla změřena pomocí měření kontaktního úhlu.

Biokompatibilita jednotlivých druhů připravených povrchů byla poté zkoumána pomocí osteoblastické buněčné linie MG-63. Cílem bylo zhodnotit adhezi a morfologii buněk, interagujících s různou topografií povrchu, s využitím mikroskopických technik. Stanovení proliferace buněk a alkalické fosfatázy jako biomarkeru aktivity osteoblastů byla hodnocena pomocí kvantitativních testů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. NANOTECHNOLOGIE

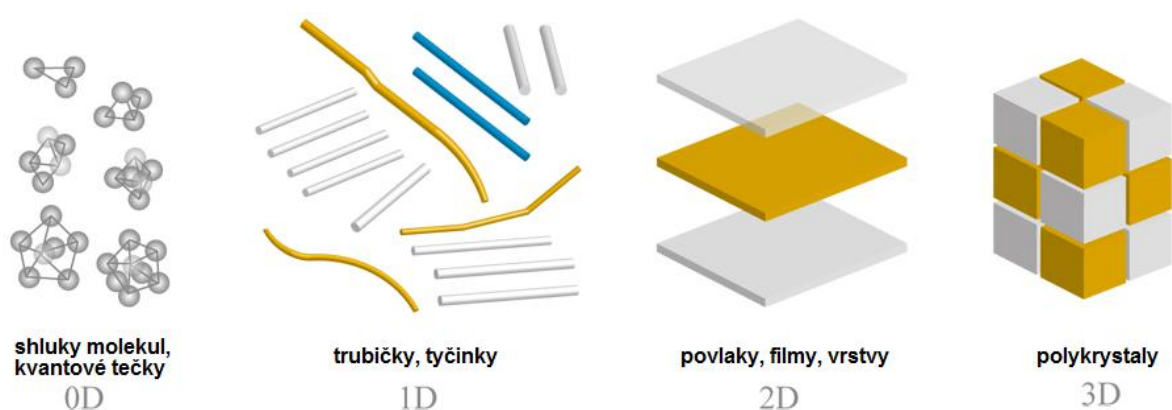
Termín nanotechnologie se objevil v roce 1974, kdy jím japonský fyzik označil novou měřicí metodu, která umožňovala výrobu součástek s přesností na nanometry. V současnosti ale pojem nanotechnologi zahrnuje interdisciplinární obory, zaměřené na zkoumání a využití nových a netradičních vlastností nanomateriálů, pro vývoj nových struktur, materiálů a zařízení. Nanotechnologie tedy často musí obsáhnout vědní obory z oblasti fyziky, chemie, molekulární biologie a inženýrství. Již z názvu vyplývá, že se zkoumané struktury či částice, tvořící stavební jednotky nanomateriálů, pohybují v rozmezí od 1 nm do 100 nm. Do 1 nm se vejdou přibližně 3-4 atomy. V tomto rozmezí velikosti se nachází i mnoho biologických objektů, jako jsou viry (10–200 nm) nebo bílkoviny (5–50 nm). Dá se tedy říci, že většina životních procesů probíhá právě v nanorozměrech.

Nanotechnologie patří k jedné z novějších vědních disciplín a obsahuje velice široké spektrum využití a možnost aplikací v mnoha oborech. Dnešní doba klade důraz na miniaturizaci (nejvíce patrné v oblasti elektroniky) a neustálé ekonomické zefektivnění a vylepšování technologií pro zlepšení a usnadnění lidských činností. Proto je rozvoj nanotechnologií velice aktuální. Jednou velkou oblastí nanotechnologií je vývoj a výzkum nanomateriálů. Mezi tyto materiály zahrnujeme nanostrukturní kovy, slitiny, tenké vrstvy a povlaky, kvantové tečky nebo nanostrukturované keramické povrchy, kompozity a různé druhy nanovláken. Další podskupinou jsou technologie pro přenos dat zahrnující obory nanofotoniky, optických materiálů a nanoelektroniky. Dále můžeme zmínit technologie pro aplikace v senzorech a elektrochemické zpracování, jako jsou filtrační membrány nebo elektrody s nanostrukturními povrchy apod. [4]

Velkou, široce zkoumanou skupinou z této oblasti jsou nanobiotechnologie a nanomedicína. „Nanomedicína může být definována jako sledování, opravování, stavba a kontrola nad člověkem na molekulové úrovni biologickým systémem, který je tvořen z nanosoučástek a nanosystémů [5].“ V tomto směru jsou zkoumány např. možnosti zapouzdřování léků a jejich cílená doprava v těle na konkrétní místo léčby pomocí nanočástic. Tím by bylo zabráněno kontaminaci nebo poškození míst, kde léčebné zásahy nejsou nutné. Dalším odvětvím je tkáňové inženýrství zabývající se zkoumáním vhodných náhrad nebo léčbou tkáňových struktur například s využitím nanovláken tvořících matrix k uchycení buněk náhradní tkáně. S tímto je úzce spojena oblast vývoje biokompatibilních či bioanalogických vrstev a materiálů. Biokompatibilita je totiž základní a stěžejní vlastností pro většinu biomedicínských aplikací, například při tvorbě implantátů. Vše zkoumáno do detailu v nanoměřítku. [4]

Jednotlivé struktury lze rozdělit podle několika aspektů. Podle dimenzí můžeme rozdělit nanostruktury na 0D, 1D, 2D a 3D. Jako 0D nanostruktury se označují tzv. kvantové tečky,

které je možno vytvořit chemickými metodami tak, že je kontrolovatelná jejich velikost. Díky těmto aktivním součástkám bylo vytvořeno již mnoho prototypů od paměťových jednotek přes senzory a detektory až po laser. Do popředí zájmu se ale v současnosti dostávají 1D struktury, které zahrnují tyčinky, trubičky, pásy a další struktury o různých geometrických parametrech. Tyto struktury umožňují zjišťovat mechanické, elektrické nebo termální závislosti materiálů. Problematická je ovšem jejich reprodukovatelnost, jelikož při výrobě hraje roli velké množství aspektů a vnějších podmínek. Dvou-rozměrné nanostruktury (2D) byly rozsáhle zkoumány hlavně v oblasti polovodičů. Lze je připravit pomocí techniky zvané epitaxe z molekulárního svazku [6]. 2D struktury jsou charakterizovány jako povrchy či povlaky o tloušťce pouze několik nanometrů. Mezi 3D, tedy trojrozměrné nanostruktury, patří práškovité, vláknité, vícevrstvé a polykrystalické struktury, v nichž jsou 0D, 1D nebo 2D konstrukční prvky v úzkém kontaktu a tvoří mezi sebou rozhraní [7]. Jednotlivé typy struktur jsou zobrazeny níže na *Obr. 1-1*.

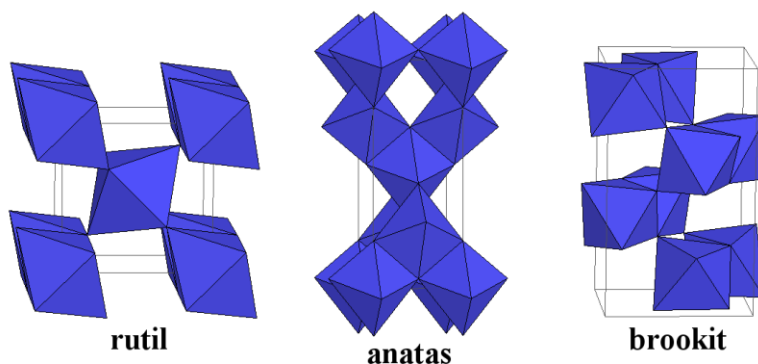


Obr. 1-1: Rozdělení nanostruktur podle prostorového uspořádání [7]

2. OXID TITANIČITÝ (TiO_2)

Z kovových oxidů je právě oxid titaničitý (TiO_2) jedním z nejzkoumanějších a nejvíce publikovaných materiálů využívaných pro tvorbu nanopovrchů. Poskytuje možnost tvorby nepřehledného množství struktur s různými geometrickými parametry, které jsou závislé na podmínkách, při kterých jsou požadované struktury vytvářeny.[8]

Samotný oxid titaničitý je nerozpustný, inertní a netoxický bílý prášek o velmi vysokém bodu tání a to nad $1800\text{ }^\circ\text{C}$. V průmyslu se využívá především jako bílý pigment při výrobě porcelánu, skla, zubních past i v potravinářství (barvivo E171) například při bělení mléka. Díky unikátním ionizačním, elektronickým vlastnostem, a biokompatibilitě, je však TiO_2 vhodný pro využití v nanotechnologiích. Vyskytuje se ve třech krystalických strukturách patrných z *Obr. 2-1*, ve formě rutilu, anatasu a brookitu. Anatas má lepší fotokatalytickou aktivitu, zatímco rutil je více chemicky stabilní forma.[9]



Obr. 2-1: Krystalické struktury TiO_2 [10]

Krystalická struktura a polovodičový charakter umožňují jeho využití v oblasti solární energetiky, kdy je tento materiál využit pro solární buňky a fotokatalytické reakce. Umožňuje též produkci vodíku z vody, který je považován za palivo budoucnosti. Tato vlastnost v kombinaci s UV zářením je využitelná také při rekultivacích nebezpečných odpadů, při čištění kontaminovaných spodních vod, ovzduší a má antibakteriální účinky. Nanodisperzní oxidy titanu jsou aktivní vůči všem vojensky významným toxickým látkám a testuje se jejich využití k odmořování vojenské techniky. Jednou z nejcennějších vlastností pro biomedicínské aplikace je ovšem biokompatibilita, díky níž je možné TiO_2 nanostruktury využít například na povrchu titanových implantátů, které jsou v současnosti využívány přibližně ve 40 % případů. Povrch anatasu je ovšem hydrofobní, což může v biomedicínských aplikacích činit jisté problémy. Tato vlastnost lze však odstranit působením např. ultrafialového záření. Po aplikaci se oxid stává silně hydrofilním až do míry, kdy se na povrchu může vytvořit kompaktní molekulární film vody. [8,11,12]

3. VÝZNAM NANOSTRUKTUROVANÝCH TiO₂ POVRCHŮ PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

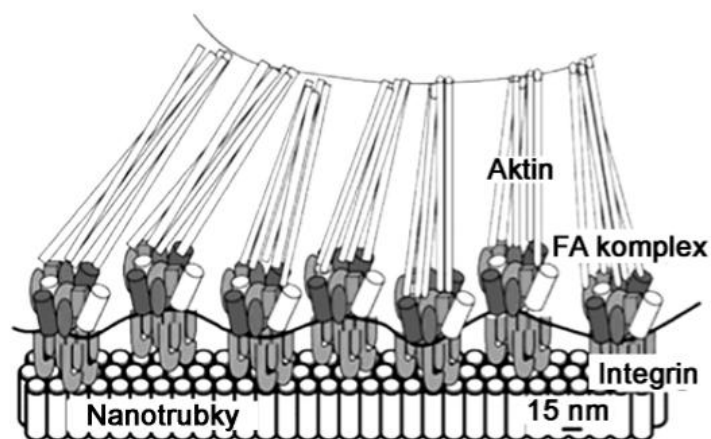
Materiály vytvářené pro biomedicínské využití musí být především biokompatibilní tedy „tolerovány buňkami“, bez cytotoxického, mutagenního a imunogenního působení a s vhodnými mechanickými vlastnostmi. Nanostruktury z oxidu titaničitého se obecně považují za příznivé prostředí pro život buněk. Stimulují její adhezi, životnost, migraci, proliferaci a metabolickou aktivitu. Tento fakt ovšem neplatí u všech struktur. Na buněčnou adhezi a proliferaci má vliv velké množství aspektů, mezi které patří smáčivost povrchu, chemické složení, struktura, parametry povrchu a další. Hlavní výhodou nanostruktur oproti hladké formě oxidu je prostor ve strukturách, který umožňuje proudění tělních tekutin důležitých k výživě buněk.

Buňky, které se podílejí na stavbě a remodelaci kosti se nazývají osteoblasty. Pokud osteoblasty produkují mezibuněčnou hmotu, vykazují vysokou aktivitu enzymu alkalické fosfatázy a tím se podílejí na mineralizaci kostní tkáně, která je nutná ke kvalitní osteointegraci implantátu. Čím je osteointegrace silnější, tím lepší je hojení a stabilita implantátu v čase.

Čistý titan ovšem není dostatečně bioaktivní, tak aby se vytvořila pevná vazba s kostí, což může vést k selhání implantátu. Proto se zkoumají různé modifikace pro zvýšení bioaktivity jako např. pokrytí TiO₂ s různým geometrickým uspořádáním, chemické ošetření, plazmové nástriky hydroxyapatitu, organické povlaky, využití různých slitin kovů a mnohé další. [13-15]

3.1. Interakce buňky s povrchem

V případě přívětivého prostředí se buňka nejdříve naváže na povrch (tzv. adheze), rozprostře se (spreading) a poté se začne množit (proliferace). Interakce mezi nanostrukturovaným povrchem a buňkou obstarávají membránové receptory tzv. integriny. Převážně ty rozhodují, zda je povrch vhodný pro buněčný růst či nikoliv. Pokud je povrch morfologicky optimální vytvoří se komplex s fokální adhezí, tzv. FA komplex. Tento komplex je tvořený seskupením integrinových receptorů, který je přímo napojen na aktinová filamenta buněčného cytoskeletu a vytváří tzv. stresová vlákna (stress fibres). Interakce buňky s tubulární nanostrukturou je znázorněna na *Obr. 3-1* níže. [15] Obecně je přijímán fakt, že na buňky nejlépe působí struktury, které se topograficky co nejvíce přibližují původní tkáni. V případě kostí se jako vhodné uvádí nanostruktury s velikostí otvorů pod 100 nm. [2]



Obr. 3-1: Interakce buňky s tubulárním nanostrukturovaným povrchem z TiO_2 [15]

3.1.1. Buněčné linie využívané pro testování nanostrukturovaných povrchů

Materiály určené pro implantace musí být nejdříve testovány in vitro na buněčných kulturách a až poté in vivo na laboratorních zvířatech. K in vitro materiálovým zkouškám se využívají buněčné linie, které představují homogenní, dobře definovanou a relativně snadno dostupnou buněčnou populaci. Hlavní výhodou těchto linií je schopnost poskytnout reprodukovatelné výsledky. Buněčné linie jsou získávány z nádorových buněk nebo selekcí buněk z primárních kultur pomocí mutagenů.

Mezi zvířecí buněčné linie využívané pro testování biomateriálů patří buňky podobné osteoblastům UMR-106, myší buňky kostní dřeně MBA-15 a myší progenitorové MC3T3-E1 buňky, které jsou sice původem fibroblasty, ovšem ve vhodném kultivačním prostředí jsou schopny diferenciaci na osteoblasty. Lidské buněčné linie podobné osteoblastům, odvozené z kostní tkáně, jsou CPC2, TE-85, MG-63, Saos-2, U-20S. I když jsou tyto buněčné linie odvozeny z osteosarkomu, zachovávají nejdůležitější znaky diferenciaci osteogenní buňky. [2]

3.1.2. Adheze buněk

Adheze neboli přilnavost buňky a její životaschopnost na nanostrukturovaném povrchu je zprostředkovávána pomocí proteinů mezibuněčné hmoty (ECM), kterými jsou nejčastěji fibronectin, vitronectin, kolagen, laminin a fibrin. Tyto proteiny jsou adsorbované z kultivačního média nebo jsou přímo syntetizovány buňkou. Molekuly těchto proteinů jsou k povrchu vázány slabými chemickými vazbami. Množství a typ těchto proteinů hraje stěžejní vliv v úspěšnosti implantace. Buňka je poté na tyto proteiny přichycena pomocí adhezích receptorů (integriny). Kromě těchto receptorů existují i další adhezivní molekuly, které se podílejí jak na tvorbě fokálních kontaktů, tak zajišťují interakci mezi buňkami vzájemně. [16]

Pro adhezi buněk je vhodný hydrofilní povrch, který způsobuje přednostní adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi (vitronectin, fibronectin). V opačném případě, tedy když je

materiál hydrofobní, dochází k přednostní adsorpci albuminu, který je pro buňku neadhesivní.[17] Navázání adsorpčních proteinů je ovlivněno také povrchovým nábojem povrchu struktury. Interakci negativně nabitě buňky osteoblastů a negativně nabitého povrchu TiO_2 zprostředkovávají právě pozitivně nabitě molekuly fibronektinu. Vyšší hustota povrchového náboje tedy usnadňuje adhezi buněk.[18]

Adheze buněk na nanostrukturované povrchy je též závislá na průměru otvorů ve struktuře, tedy pórů či trubek. Adheze a rozptýlení buňky roste s klesajícím průměrem. Různé studie ovšem publikují celkem rozličné výsledky ohledně ideální velikosti otvorů ve struktuře. Obecně se ovšem tyto hodnoty pohybují od 15 nm [19] do 40 nm [2] pro nanotrubice, které jsou z pohledu nanostruktur nejčastěji studovány.

Adheze buněk se primárně hodnotí podle počtu navázaných buněk v čase. Může být hodnocena také pomocí vizualizace buněk za přispění fluorescenčního značení nebo pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu, kdy je nutné buňky vhodně upravit. Podle morfologie buněk lze rozhodnout, zda je prostředí pro buňku příznivé či nikoliv. Můžeme rozlišit tři různé tvary buňky, které jsou zobrazeny na *Obr. 3-2* a to kruhovou, rozvětvenou nebo podlouhlou. Navázáním fluorescenčních barev lze obarvit například vinculin, což je protein ve fokálních adhezních komplexech, který se podílí na vazbě integrinu a aktinu cytoskeletu buňky. Dále lze barvit aktin, který je hlavní složkou mikrofilament, které tvoří oporu buňky a tím udávají její tvar. Lze i specificky barvit jádro buňky.



Obr. 3-2: Různé morfologie buněk zobrazených pomocí fluorescenční mikroskopie, zelená-aktin, červená-vinculin, modrá-jádro buňky [20]

Fluorescence jako taková vzniká ozářením vzorku specifickou vlnovou délkou, což vede k vybuzení fluorescenční barvy (fluoroforu) a k následnému návratu na původní energetickou hladinu za současného vyzáření fotonů světla o známé vlnové délce, která je opět specifické pro daný typ fluorescenční barvy. Nejběžněji používaná fluorescenční sonda k určení životaschopnosti buňky je například calcein, který využívá propustnosti cytoplazmatické membrány a je zadržován v živých buňkách, které nemají porušenou membránu. Emisní spektrum calceinu je v oblasti zelené barvy. Dalším velice využívaným

barvivem je proprium jodid, který se váže na nukleové kyseliny a jeho emisní spektrum je v červené oblasti. Pomocí těchto dvou fluoroforů lze dobře odlišit mrtvé a živé buňky. [21]

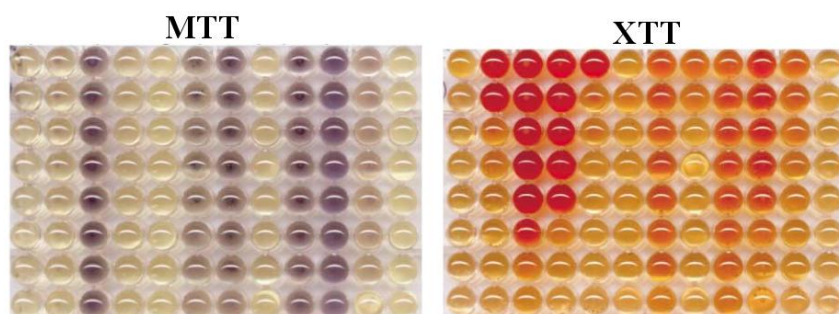
V případě vizualizace buněk pomocí SEM mikroskopu jsou buňky nejdříve fixovány pomocí 2-2,5% glutaraldehydu nebo paraformaldehydu a poté jsou dehydratovány v několika alkoholových roztocích s rostoucím gradientem od 10% [22], 30% [23] nebo 50% [13] vždy do 100% čistého roztoku alkoholu. Tím se buňky zbaví veškeré vlhkosti, která je nežádoucím jevem při zobrazování elektronovým mikroskopem. Pro lepší zviditelnění buněk se někdy využívá též pokovení tenkou vrstvou, nejčastěji zlata [22], jeho slitin nebo platiny [24], které přispívá ke zvýšení vodivosti povrchu.

3.1.3. Proliferace buněk

Proliferace je zvyšování počtu buněk v důsledku růstu a dělení. Pokud buňka proliferuje, znamená to, že je na povrchu schopna přežít a množit se. Pro životaschopnost a proliferaci buněk jsou klíčové signály, přijímané prostřednictvím interakcí mezi buňkami vzájemně a právě také mezi buňkou a substrátem. Pokud dochází k příjmu všech potřebných signálů z okolí, může buňka proliferovat.

Pro proliferaci je primárně nutná dobrá adheze buněk. Na proliferaci má, jako v případě adheze, vliv celá řada faktorů, mezi které patří smáčivost povrchu, povrchový náboj, drsnost a toxicita povrchu. Např. vrstvy s nanostrukturovaným povrchem vykazují lepší proliferaci kostních buněk, se zvyšující se drsností materiálu ovšem klesá schopnost proliferace. [2]

Proliferaci je možné měřit pomocí měření obsahu DNA za využití fluorescence [25]. Nejčastěji se ovšem využívají MTT nebo XTT testy. MTT test je metoda, která je založena na redukci žlutého tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustnou formu zvanou formazan. Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se poté rozpouští přidáním silného detergentu (DMSO, SDS). Charakteristické modro-fialové zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 - 570 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. Čím tmavší je barva, tím vyšší je absorbance a tím je také vyšší procento živých buněk. Lineární vztah absorbance k počtu buněk umožňuje přesnou kvantifikaci změn a určuje míru proliferace buněk. [26] XTT test oproti tomu využívá odlišného derivátu tetrazoliové soli, který je redukován mitochondriemi za vzniku oranžového barviva rozpustného ve vodě, čímž se zvyšuje citlivost této metody. Rozdíl mezi XTT a MTT testy v barevnosti vzorků o různé koncentraci buněk je patrný z *Obr. 3-3*. Koncentrace barviva je jako v předchozím případě přímo úměrná metabolicky aktivním buňkám. [27]



Obr. 3-3: Příklad zabarvení vzorků s různou koncentrací živých buněk po MTT a XTT testu proliferace [28]

Během proliferace mohou být detekovány také enzymy, které buňka vytváří. Při zrání a formování kostní tkáně se buňka vyznačuje například nadměrnou expresí alkalické fosfatázy (ALP). Pokud tedy buňka produkuje větší množství tohoto enzymu, znamená to, že buňka proliferuje. Aktivita ALP je markerem schopnosti diferenciaci buněk, což je za normálních podmínek v těle známkou například onemocnění jater nebo kostí. Po implantaci je ovšem zvýšená aktivita žádoucí, jelikož značí dobrou osteointegraci buněk na implantát. Přítomnost alkalické fosfatázy je detekována pomocí p-nitrofenyl fosfátu. Tato látka je substrátem, který v přítomnosti ALP defosforyluje a mění se na žlutý produkt. Poté lze koncentraci měřit, obdobně jako u MTT a XTT testů proliferace, pomocí absorbance na specifické vlnové délce, která je stanovena s ohledem na vytvořený produkt reakce. Konkrétně u přeměněného p-nitrofenyl fosfátu na p-nitrofenol je to 405 nm. Alkalická fosfatáza se vyhodnocuje pomocí její aktivity, která se přepočítává pomocí jednoduché rovnice a stanovuje se v jednotkách [U/ml]. U je zde tzv. enzymová jednotka udávající množství enzymu katalyzující přeměnu jednoho mikromolu substrátu za jednu minutu. [22,23,29]

3.2. Biomedicínské aplikace titanu

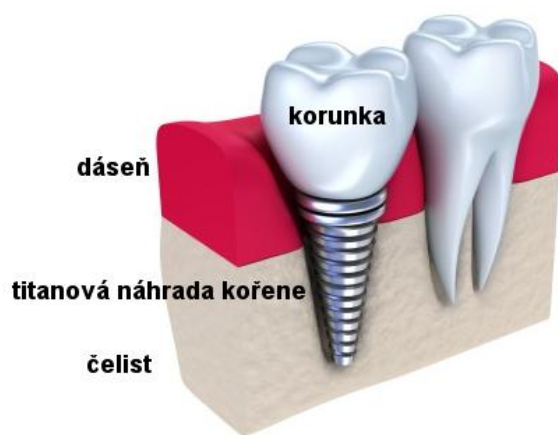
Rozvoj prvních aplikací titanu v oblasti medicíny byl založen, tak jako mnoho dalších, především na pokroku ve výrobních procesech a zvyšujících se požadavcích ve vojenském a leteckém průmyslu za druhé světové války. Titan se používal především u chirurgických a zubních zařízení. Využití titanu a jeho slitin jako biomateriálu oproti nerezovým slitinám na bázi kobaltu vzrůstalo. Oproti těmto nerezovým slitinám se ty titanové vyznačovaly menším modulem pružnosti, lepší biokompatibilitou a také lepší odolností vůči korozi. Tyto unikátní vlastnosti podnítily rozvoj slitin na bázi titanu a další vývoj například ortopedických metastabilních slitin.[30] Mezi biomedicínské aplikace titanu a titanových sloučenin patří především náhrady tvrdých tkání (ortopedické a zubní implantáty), dále srdeční a kardiovaskulární náhrady a aplikace, výroba stentů pro močový měchýř a využití nanostrukturovaného povrchu pro antibakteriální aktivitu a přísun léků.

3.2.1. Náhrady tvrdých tkání

Tvrdé tkáně jsou často poškozeny v důsledku úrazů, stárnutí, a jiných příčin. Je běžnou praxí chirurgicky nahradit poškozené kosti pomocí umělých náhrad. V závislosti na oblastech, ve kterých jsou implantáty vloženy a funkci, kterou mají poskytovat, se různí požadavky na endoprotetické materiály. Výše uvedené vlastnosti, titan a jeho sloučeniny předurčují k využití na kostní náhrady. Nízký modul pružnosti titanu a jeho slitin je obecně chápán jako biomechanická výhoda, protože menší modul pružnosti může mít za následek menší namáhání kosti.[30]

Rozhodující vliv na úspěšnou implantaci kostní náhrady má samozřejmě tvar a kostní ukotvení implantátu. Kvalitní osteointegrace zajišťuje stav dlouhodobé stability protézy. Vlastnosti materiálu, které mohou osteointegraci ovlivnit jsou příprava povrchu, chemické složení, povrchové nátěry a modifikace, sterilizační postupy, topografie a mnoho dalších. Může jí značně ovlivnit i nanomodifikace povrch implantátu. Hojení tkáně okolo implantátů zahrnuje kaskádu buněčných i nebuněčných biologických procesů, které se odehrávají na rozhraní kovového materiálu a kosti. Kaskáda těchto biologických událostí je regulována pomocí růstových faktorů, které jsou aktivovány právě na rozhraní kov-kostní tkáň. Již několik studií potvrdilo, že trubičkovitá TiO_2 struktura zlepšuje, oproti klasickým hladkým povrchům, proliferaci a adhezi buněk. Zvýšení buněčné aktivity bylo prokázáno jak in vitro, tak in vivo studiích. Nanotubulární oxidové vrstvy zlepšují pevnost srůstu kosti s implantátem a též tvorbu kolagenu. Výsledky testování titanových slitin (např. Ti-6Al-7Nb, TiZr) naznačují jejich budoucí využití v ortopedické buněčné terapii. Dalším klíčovým faktorem u kostních implantátů je tvorba hydroxyapatitu na povrchu implantátu, které se tvoří pomocí tělních tekutin. Je prokázáno, že se tato látka tvoří mnohem rychleji na strukturovaných TiO_2 površích, oproti hladkým povrchům.[18,30-32]

Nejčastějším využitím titanu je náhrada kyčelního kloubu, kde se kovový dřík s hlavicí uchytí ve stehenní kosti. Další častou aplikací jsou zubní implantáty, kde je kořen zubu nahrazen titanovým šroubovitým pilířem, který se usazuje do čelisti podle Obr. 3-4. Podle polohy a tvaru je můžeme specifikovat jako subperiostální, transostální a endoostální. Transostální a endoostální jsou zaváděny do horní nebo dolní čelisti. Subperiostální implantát se zavádí mezi kost a dásně. Používá se u pacientů, kteří nemají dostatečně vyvinutou kost pro zavedení kořenového implantátu. Tento typ je používán jen zřídka. [30]



Obr. 3-4: Implantát zubního kořene z titanu [33]

Bakteriální infekce od implantabilních zdravotnických prostředků je problém, který nelze léčit tradičními antibiotiky, vzhledem k zvyšující se převaze antimikrobiální rezistence a tvorbě biofilmu. Nanotubulární struktury ovšem mohou značně ovlivnit reakci bakterií jako je *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*, zodpovědných za ortopedické a další infekce související se zdravotnickými prostředky. Trubičky z TiO_2 o větších průměrech značně snižují počet těchto bakterií. Antibakteriální aktivita titanu a jeho slitin by mohla být způsobena právě nanostrukturovaným povrchem v závislosti na průměru pórů a trubek. Při použití titanových slitin, které obsahují prvky, které by mohly inhibovat bakterie (např. zirkon), byl prokázán zvýšený antibakteriální účinek.

Současné ortopedické implantáty mají životnost okolo 10 až 15 let. To je způsobeno celou řadou důvodů, jako jsou infekce, záněty a špatná osteointegrace. Pro zlepšení vlastností titanu pro tyto aplikace je možné potáhnout titan oxidovou nanostrukturovanou vrstvou dopovanou léčivem např. penicilinem, který redukuje infekci a zánětlivé reakce. Léčivo se na vrstvu zachytí pomocí fyzikální adsorpce nebo depozicí ze simulované tělní tekutiny. Eluční čas léčiva při depozici je okolo tří dnů. Naplněné tubulární struktury lze také pokrýt hydrofobním povlakem, který se odstraní fotokatalytickou interakcí a tím lze dosáhnout uvolnění léčiva v konkrétní čas. TiO_2 trubičky je také možné naplnit magnetickými částicemi, například z oxidu železitého a tak umožnit magnetické navádění struktury na požadovaná místa. Takováto struktura může být poté použita přímo pro fotokatalytické reakce s buňkami nebo tkání. To by se dalo využít pro selektivní ničení nádorových buněk. Pro zničení nádorových buněk je možno využít i účinků UV záření. Je ale nutné zajistit přímý přístup záření na TiO_2 nanotrubičky, což je značně složité. [31]

3.2.2. Ostatní využití

Jako další možnost využití nanostrukturovaných, především tubulárních, TiO_2 povrchů jsou aplikace pro močový měchýř a močové cesty. Povrch močového ústrojí je často nedokonale pokryt uroteliálními buňkami, které tvoří výstelku močového měchýře a močových cest. Ztráta této výstelky má vliv i na hlubší buněčné vrstvy a tím se zhoršuje imunitní schopnost dané části. Stent lze popsat jako výstuhu, která zajišťuje odtok moči.

Komplikace při zavedení stentu jsou infekce, nebo ucpávání vedoucí ke kornatění tkáně. Těmto komplikacím lze celkem dobře zabránit tím, že se podpoří tvorba monovrstvy buněk na povrchu stentu. Tato vrstva buněk poté zabrání interakci imunitních buněk s bakteriemi na stentu. Jedinečná povrchová úprava nanostruktur, vytvořená pomocí nanotechnologií, může podpořit adsorpci proteinů důležitých pro uroterální buňky a tím zlepšit adhezi a proliferaci buněk. Pro tyto aplikace ovšem existuje zatím poměrně málo studií, i přes slibné dosažené výsledky při pokrytí nanotubulární vrstvou v porovnání s klasickými titanovými stenty. [18,31]

Díky svým unikátním vlastnostem je titan využíván i pro implantáty a aplikace, které jsou v kontaktu s krví a oběhovým systémem. Nejdříve se využíval na ochranná pouzdra kardiostimulátorů, dále na umělé srdeční chlopně, umělé srdce a zařízení pro srdeční oběh. U umělého srdce a přístrojů pro udržení krevního oběhu je titan využíván na mechanické části, jako jsou čerpadla a také i jako povrchový materiál, který je ve styku s krví. Umělá srdce vyrobená výhradně z titanu, nebyla ovšem v klinické praxi příliš úspěšná. Problém byl ve srážlivosti krve ve styku s povrchem zařízení. Hlavními výhodami titanu v kardiovaskulárních aplikacích je jeho síla a nemagnetický charakter. To ovšem může zapříčinit několik artefaktů při vyšetřování pomocí magnetické rezonance (MRI). V praxi se využívají také protézy srdečních chlopní. Ty jsou konstruovány z kroužku a vzpěr.

Titan je využíván i jako materiál pro kardiovaskulární stenty, které vyztužují cévy a tím udržují průchodnost krevního oběhu. Takový stent je zaváděn do cévy pomocí speciálního katetru s balónkem, který roztáhne stent na požadovaném místě. To může zapříčinit poškození cévy a trombotickou okluzi cévy. Z tohoto důvodu je nutné zlepšit antitrombotické vlastnosti stentů. Toho lze docílit pokrytím nanostrukturované oxidové vrstvy, na které se lépe adsorbují krevní proteiny, tím snižují trombogenní účinky a také se zvyšuje krevní kompatibilita. [30,31]

4. FUNKCIONALIZACE POVRCHŮ

Pro různé biomedicínské aplikace je vhodné modifikovat povrch struktury pro zlepšení přilnavosti buňky na povrch. Tyto nanostrukturované povrchy mohou být pozměněny různými metodami. Lze měnit povrchové vlastnosti navázáním protilátek nebo peptidů nebo upravit smáčivost povrchu pomocí aplikace UV záření, které pozmění polaritu vrstvy.[18]

4.1. Růstové faktory

Růstové faktory lze navázat na povrchy např. přes SAM monovrstvy. Tím dochází ke zvýšené diferenciaci kmenových buněk na buňky specifické. Růstové faktory využívané k takovéto modifikaci jsou kostní morfogenetický protein-2, epidermální faktory nebo vaskulární endoteliální růstové faktory. Například v případě imobilizace epidermálního růstového faktoru byla prokázána větší proliferace buněk na tubulární struktuře s průměrem trubek 100 nm. [18]

4.2. Proteiny

Fibronektin, vitronektin, kolagen, laminin a fibrin jsou proteiny, které hrají velice důležitou roli v modifikaci nanostrukturovaného povrchu oxidu titaničitého. Mohou totiž působit jako prostředník mezi povrchem a buněčnou membránou a tím podporují adhezi buňky. Navázání buněčné membrány na povrch nanostrukturovaného titanu probíhá ve dvou krocích. Nejprve dochází k nespecifickému kontaktu v důsledku působení elektrostatických sil a poté dochází ke specifické vazbě membránových receptorů a tvorbě fokálního kontaktu. [18]

4.3. Plasma

Funkcionalizace pomocí plazmy je považována za velice čistý, jednoduchý a flexibilní způsob, kterým lze pozměnit jak chemické, tak morfologické vlastnosti povrchů. Chemická modifikace je způsobena poskytnutím chemických funkčních skupin (karboxylové, aminové, hydroxylové) skrze plasmu. Například využitím allylaminu je poskytnuta stabilní a biologicky kompatibilní aminová funkční plocha, kterou lze využít pro zlepšení buněčné adheze, DNA a proteinové adsorpce, imobilizace enzymu nebo pro využití v biosenzorech. [18]

4.4. Modifikace pomocí UV záření

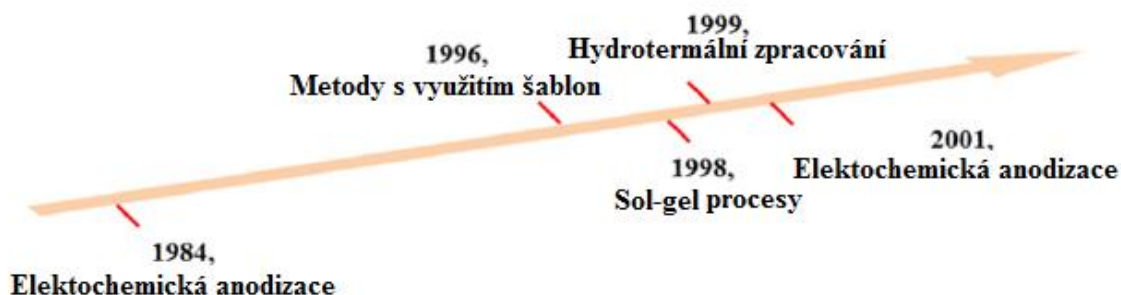
Pomocí UV záření lze pozměnit vlastnosti nanostrukturovaných povrchů a tím docílit lepší interakce povrchu s buňkou. Bylo prokázáno, že po aplikaci záření po dobu 48 hodin se zvyšuje osteokonduktivní kapacita, což znamená, že se zlepšují povrchové vlastnosti a povrch může lépe interagovat s okolní tkání [34]. Takto upravené povrchy vykazují také lepší adhezi,

proliferaci i diferenciaci buněk. Zlepšení adheze buněk je doprovázeno též větším a kvalitnějším vývojem cytoskeletu buněk [35]. Povrchy zvyšují též adsorpci proteinů, které jsou stěžejní pro přichycení buňky k povrchu. UV záření tedy bezpochyby zvyšuje bioaktivitu povrchu a umožňuje rychlejší integraci mezi kostními buňkami a TiO₂ povrchem. [36]

Smáčivost povrchu závisí na době aplikace UV záření. Čím déle je povrch vystaven záření, tím více smáčivým se stává. Dalším parametrem, který má vliv na modifikaci povrchu je vlnová délka použitého UV záření. Lepší hydrofilizace povrchu bylo dosaženo ozářením UVC o vlnové délce 250 nm oproti UVA s vlnovou délkou 360 nm. Rychlost adsorpce bílkovin a upevnění buňky ovšem primárně závisí na procentu reagujícího uhlíku na TiO₂ a nikoli na hydrofilitě povrchu. [36,37]

5. VÝROBA TiO_2 NANOSTRUKTUR

Tvorba TiO_2 nanostruktur je možná několika různými přístupy, kterými jsou sol-gel metody, hydrotermální přístupy, metody za asistence šablon a především elektrochemické metody, kde se využívá anodická oxidace vrstvy titanu. Časový vývoj metod je zobrazen na Obr. 5-1.



Obr. 5-1: Vývoj metod výroby TiO_2 nanotrubiček v čase [18]

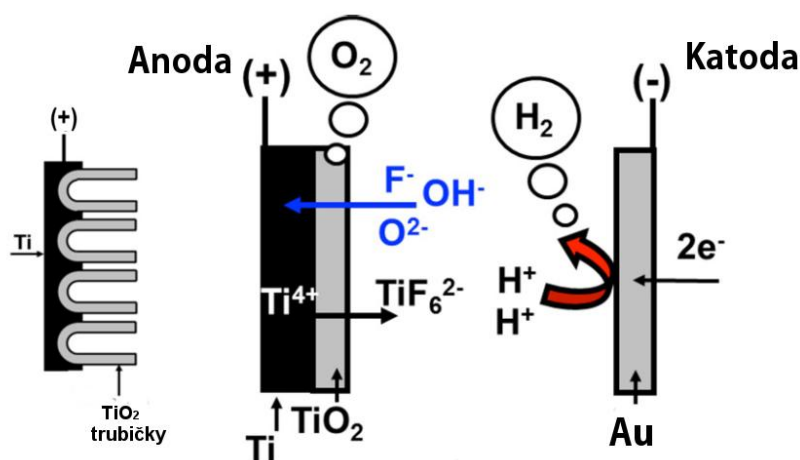
Při využití šablon lze získat širokou škálu požadovaných struktur povrchů takřka přímo. Šablona má specifický tvar, průměr a hustotu uspořádání, které určují výsledný povrch. Po vytvoření vhodné šablony je také zajištěna kvalitní reprodukovatelnost. Šablony se tvoří z různých polymerů, přírodních materiálů nebo vrstev anodizovaných kovů (Al, Ti, Mg). Nejčastěji je šablona tvořena právě anodizovanou hliníkovou vrstvou, jejíž příprava je dobře kontrolovatelná, a stejně jako titan tvoří pravidelné struktury. Zkratka pro použití hliníkové šablony je AAO (Anodic Aluminium Oxide). Tvorba struktur s využitím aluminové šablony zahrnuje vždy více kroků. Prvním krokem je vytvoření šablony anodickou oxidací. Poté se skrze šablonu nechá prostoupit oxidová vrstva TiO_2 a následuje odstranění šablony. Hliníkové šablony se odstraňují použitím kyselin nebo alkalickými roztoky. V případě využití šablon při sol-gel metodách nebo při syntéze oxidu parní depozicí, dochází v procesu k sušení nebo vypalování oxidové vrstvy, což komplikuje jejich pozdější odstranění. Touto metodou se nejčastěji tvoří nanotyčinky. [38]

Další netradiční způsoby tvorby nanostruktur využívají mikrovlny o frekvencích 900-2450 MHz nebo chemické účinky ultrazvuku, kterými je akustická kavitace bublinek v kapalině [39]. Nanovrstvy pro medicínské využití jsou ovšem vytvářeny především konvenční elektrochemickou anodizací kovového titanu v podobě fólie nebo tenké vrstvy. Použití titanové fólie v dosavadních studiích převažuje.

5.1. Anodická oxidace

Tvorba nanostrukturovaných povrchů touto elektrochemickou metodou prošla za posledních 20 let velkým vývojem a stala se jednou z nejvyužívanějších metod výroby TiO_2 povrchů. Výroba anodickou oxidací se provádí za potenciostatických podmínek, tedy při aplikaci

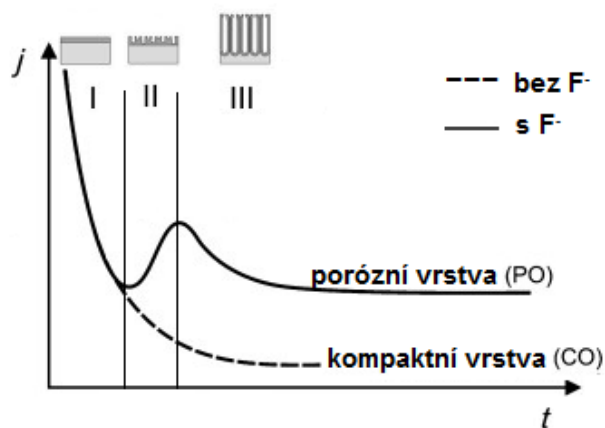
konstantního napětí. Oxidace vrstvy kovového titanu začíná probíhat po vnesení anodického napětí podle *Obr. 5-2*. Vrstva kovového titanu je napojena na kladný pól (anoda) a elektroda je připojena k zápornému pólu (katoda). Jako katoda se nejčastěji využívá platinová (Pt) elektroda. Pro tvorbu oxidových nanostruktur je potřeba, aby proces probíhal v elektrolytu, který obsahuje fluoridové ionty a nízký obsah vody. Díky krystalické struktuře titanu se vytvářejí samoorganizované struktury v podobě pórů nebo trubiček. Oxidová vrstva narůstá kolmo na kovový substrát. Výhodou tohoto procesu je rychlost. Nanostrukturované povrchy lze vytvořit již za několik minut. Nelze ovšem obsáhnout příliš velké povrchy, tak aby byl jejich povrch zcela homogenní.



Obr. 5-2: Schéma formování TiO_2 trubiček anodickou oxidací a zobrazení migrace iontů [40]

5.1.1. Časový průběh

Jelikož aplikujeme konstantní napětí, můžeme pozorovat stadia tvorby oxidové vrstvy, pomocí měření průběhu elektrického proudu, nebo lépe proudové hustoty, v čase. V případě vytváření kompaktních vrstev proudová hustota postupně klesá a oxidová vrstva na titanu pravidelně narůstá. U porózních struktur a trubiček oxidovaných ve vodných a organických elektrolytech jsou ovšem rozeznatelná tři stadia růstu nanovrstvy, které jsou vyznačeny v *Obr. 5-3*. Tyto fáze ilustrují přechodné jevy vrstvy oxidu titaničitého.[40]

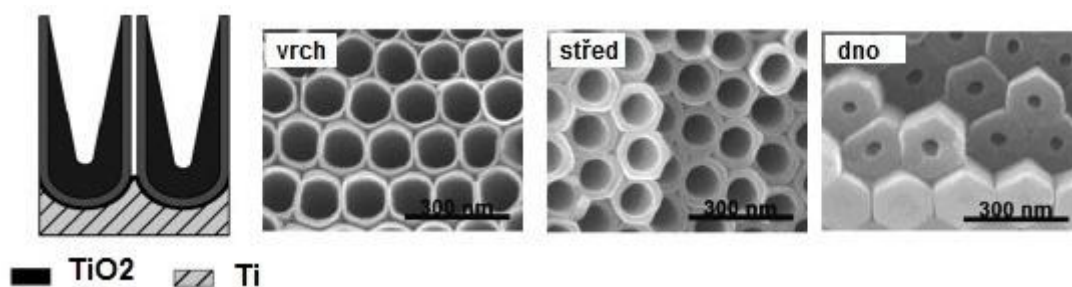


Obr. 5-3: Optimální proudová charakteristika průběhu anodické oxidace [8]

V prvním stádiu (fáze I) začíná proces anodické oxidace. Tato fáze začíná aplikací elektrického napětí, kdy začne mezi katodou a anodou probíhat elektrický proud. Ten ovšem rychle klesá na minimální hodnotu. To je zapříčiněno vytvořením odolné bariérové vrstvy TiO_2 . Při aplikaci 20-25 V tato vrstva dorůstá až 50 nm. Díky přítomnosti iontů ovšem oxidační proces nekončí. Přítomné ionty (O^{2-} , OH^- , Ti^{4+} , F^-) se pohybují skrze bariérovou oxidovou vrstvu a především díky fluoridovému iontu se začíná indikovat tvorba pórů. Přestože je již započatý proces tvorby pórů, křivka klesá na minimum, jelikož proces je neustále ovlivněn velkým odporem odolné bariérové vrstvy.

Následuje druhá fáze (fáze II), při níž proud začne stoupat na maximum, jak pokračuje tvorba pórů. Bariérová vrstva je již prostoupěna otvory. Odpor oxidové vrstvy se snižuje a v oxidu se vytváří pórovitá struktura. Čím více pórů je, tím lépe se tvoří a tím snadněji mohou ionty prostupovat oxidem. Tato fáze představuje přechod od tenké anodické vrstvy k vysokým strukturovaným povrchům. Omezené mechanické napětí zastaví nárůst oxidové vrstvy. Oxid je ovšem tlačěn stále směrem vzhůru a tím se vytváří silnější porózní nebo trubičkový povrch. Toto se děje díky snaze minimalizovat napětí na rozhraní kov-kovový oxid.

Proud nakonec dosáhne konstantní hodnoty nebo klesne (fáze III). To značí dosažení ustáleného stavu a vznik tubulární (trubičkovité) nebo porózní struktury. Po ustálení se již oxidová vrstva nemění. Stabilní stav je dosažen díky rovnováze rychlosti tvorby oxidu na rozhraní kov-oxid a rozpouštění oxidu na rozhraní oxidové vrstvy s elektrolytem. U trubiček může docházet na konci procesu k tloušťnutí stěny u dna trubičky, kde je oxid v kontaktu s kovovým titanem a naopak k ztenčování vrchních stěn. Toto formování je zobrazeno níže na Obr. 5-4. Při delších procesech oxidace může být formování ovlivněno difuzními efekty, mícháním elektrolytu v průběhu (ovlivnění gravitačních efektů) a viskozitou. [8,40]



Obr. 5-4: Gradient stěny tubulárního povrchu z TiO_2 a jeho SEM charakterizace

5.1.2. Tvorba kompaktní vrstvy

Anodizace titanu a tvorba kompaktní nebo též bariérové oxidové vrstvy je z historického hlediska spojena s výrobou šperků, kde je využito interferenčního efektu různě vysoké vrstvy oxidové vrstvy. Oxidová vrstva se vytváří díky pohybu iontů při elektrickém polem asistované anodické oxidaci. Jak oxidová vrstva roste, zvyšuje se odpor a tím se celý proces zpomaluje. Odpor oxidové vrstvy je natolik velký, že se po nějaké době proces růstu oxidové vrstvy zastaví úplně. Finální tloušťka bariérové vrstvy může dosahovat až stovek nanometrů. Elektrolyty vedoucí k tvorbě bariérové vrstvy jsou roztoky kyseliny sírové, kyseliny fosforečné nebo kyseliny octové. [40]

5.1.3. Tvorba porózní vrstvy

Porózní a tubulární TiO_2 vrstvy se obecně tvoří anodickou oxidací v elektrolytech s obsahem fluoridových iontů. Za kontrolovaných podmínek se poté tvoří samoorganizované struktury. Fluoridové ionty ovšem nemusí být podmínkou. Bylo prokázáno, že lze vytvořit tubulární TiO_2 strukturu oxidací v chloristanových, chloridových nebo bromidových elektrolytech. Použití elektrolytů s fluoridovými ionty je ovšem nejvyužívanější. Titan a oxid titaničitý se nejlépe rozpouští právě ve fluorid obsahujících elektrolytech. Nejvíce v těch s obsahem kyseliny fluorovodíkové (HF). Při rozpouštění oxidové vrstvy je nutno dosáhnout konstantní rychlosti rozpouštění v každém vzniklém póru, aby se dosáhlo samoorganizované tubulární struktury. Je tedy nutné odladit obsah iontů v elektrolytu tak, aby bylo dosaženo rovnováhy mezi tvorbou a rozpouštěním oxidu. Pokud této rovnováhy není docíleno, na tubulárních vrstvách se mohou tvořit vrchní nežádoucí struktury. [40]

5.1.4. Tvorba tyčinek a teček pomocí aluminové šablony

Většina studií zabývající se tvorbou těchto struktur využívají pro jejich tvorbu především sol-gel nebo hydrotermální přístupy. Lze však vytvořit i kvalitní struktury pomocí anodické oxidace. Hlavní výhodou použití šablony je dobrá reprodukovatelnost struktury. Při anodické oxidaci je možné vytvořit v jednom kroku, jak aluminovou šablonu, tak oxidovou strukturu titanu. Alumina je v podstatě porózní struktura tvořená oxidem hlinitým (Al_2O_3). Vytváří se

stejně jako porózní nebo tubulární struktury TiO_2 , avšak je méně citlivá na parametry elektrolytu. Napětí, které je použito při vytváření aluminové šablony ovlivňuje velikost pórů. Je možno dosáhnout rozměrů od desítek až po stovky nanometrů, podle požadované velikosti tyčinek. Aluminové šablony se po použití musí odstranit pomocí kyselých nebo alkalických roztoků. Jednou z možností je například leptadlo z oxidu chromového (CrO_3) a kyseliny fosforečné (H_3PO_4) při teplotách od 40 do 60 °C [41] nebo zředěný hydroxid draselný (KOH) [42].

Kvantové tečky z TiO_2 vynikají mezi dalšími hlavně svou biokompatibilitou, což je předurčuje k biomedicínským účelům. Většina kvantových teček je totiž toxických, kvůli kademnatým iontům. Klíčovým parametrem pro dosažení teček je použité napětí a také čas potřebný k překonání spodní bariérové vrstvy aluminové šablony. Velký vliv má také použití vhodného elektrolytu tak, aby nedošlo ke kontaminaci produktu. Díky rozdílným anodizačním vlastnostem hliníku a titanu, je možné použít na oba kovy stejný elektrolyt. Ve studii [43] byla použita kyselina sírová o koncentracích od 1 do 3 mol.l^{-1} . Lze však využít i jiné kyselé elektrolyty. Co se týče napětí, bylo prokázáno, že se zvyšujícím se napětím roste průměr pórů šablony a tedy i velikost TiO_2 teček. Teplota při procesu by se měla pohybovat okolo 10 °C. Nižší teplota totiž zajišťuje větší stabilitu výsledné struktury. [41,43]

Stejně jako u teček, tak i u tyčinkovitých struktur má na výsledný povrch vliv použitý elektrolyt, teplota, napětí a čas anodické oxidace. I v tomto případě je nutné nastavit napětí dostatečně vysoké, aby byla překonána spodní bariérová vrstva předem vytvořené aluminové šablony. U tyčinek se však používá lehce vyššího napětí, jelikož potřebujeme, aby oxidová vrstva titanu prorostla ideálně celou šablonou. U napětí pro prostoupení titanové vrstvy šablonou se využívá náběhová rampa v rozmezí od 0,1 V/s [42] do 1 V/s [44]. Udává se, že náběžná hrana potenciálu zajišťuje delší tyčinkovité struktury. Použité napětí závisí na tloušťce šablony a může nabývat hodnoty od 10 do hodnoty 200 V. Vyšší napětí zajišťuje rychlejší proces oxidace, ovšem ovlivňuje i stabilitu struktury. I v těchto případech je dobré provádět anodickou oxidaci při nižší teplotě než je pokojová. [42]

5.1.5. Chemický model průběhu

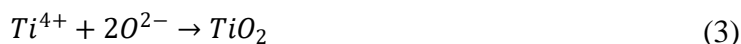
Proudově-časová křivka průběhu anodické oxidace a rentgenová spektroskopie (XPS: X-ray Photospectroscopy Studies) umožnila vypracování chemického modelu růstu TiO_2 nanovrstvy. Tento chemický model je popsán pro situace s použitím vodných a organických elektrolytů, vzhledem k tomu, že je přítomnost vody nezbytná pro tvorbu nanotrubíček. Bylo prokázáno, že vnější anodická vrstva obsahuje oproti vnitřní přebytek hydroxilových (OH^-) iontů. Tato hydratovaná vrstva je obecně považována za hydroxid titaničitý ($\text{Ti}(\text{OH})_4$) a vnitřní vrstva je reprezentována TiO_2 . Ve skutečnosti ovšem není vrstva rozdělena na čistě hydratovanou a dehydratovanou, ale je určena koncentračním gradientem, který lze zapsat jako $\text{TiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Stupeň hydratačního gradientu skrze vrstvu je určen rychlostí průběhu

anodizace. Gradient roste s rychlostí, jelikož při rychlejší oxidaci je do procesu zapojeno více vody.

Na anodě, kde probíhá oxidace, se uvolňují Ti^{4+} ionty a elektrony podle rovnice (1).



Společně s tím dochází k disociaci vody a tvorbě OH^{-} a O^{2-} iontů díky vysokému elektrickému poli, které usnadňuje toto štěpení molekul vody. Toto vede k tvorbě hydratovaného oxidu podle rovnice (2) a k tvorbě oxidu čistého podle rovnice (3). Další oxid se poté tvoří, když hydratovaná oxidová vrstva uvolňuje vodu (4).



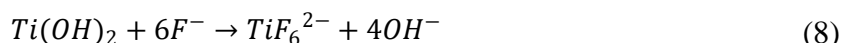
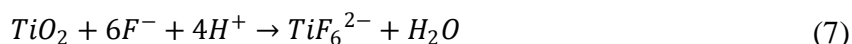
Reakce, které popisují rovnice (2-4), jsou tzv. asistované elektrickým polem, jelikož použitý potenciál kontroluje rychlost pohybu iontů na rozhraní kov-kovový oxid. Na katodě přitom probíhá chemická reakce podle rovnice (5).



Po spojení výše uvedených rovnic, dostaneme celkový proces tvorby oxidu, který je popsán rovnicí (6).



Fluoridové ionty, které jsou přítomné v elektrolytu, zapříchují rozpouštění hydratované vrstvy oxidu podle rovnice (7) a (8) a také reagují s ionty Ti^{4+} podle rovnice (9). Kombinace účinku fluoridových iontů (chemické rozpouštění) s elektrickým polem, zeslabuje vazbu titanu (Ti) s kyslíkem (O). Přítomnost fluoridových iontů vede k tvorbě fluoridových komplexů, ze kterých je nejstabilnější TiF_6^{2-} . Tyto komplexy se vytváří také díky aplikovanému potenciálu, který pohání záporně nabitě fluoridové ionty směrem ke vzorku (anodě).



Předpokládá se, že vzájemný vztah mezi tvorbou oxidu a rozpouštěním oxidu, je klíčovým faktorem, který určuje strukturu výsledného povrchu. Na anodě dochází také k vývoji kyslíku podle rovnice (10). Tato vedlejší reakce může ovšem také značně ovlivnit výslednou morfologii oxidové vrstvy.



Vliv kyslíku je samozřejmě větší ve vodných elektrolytech. Byl ovšem pozorován i u elektrolytů organických, kde objemové procento vody převyšovalo 5 %, což je relativně malé množství. [40]

6. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ GEOMETRII STRUKTUR

Na výslednou geometrii struktury má vliv velké množství vnějších faktorů. Pro dosažení požadovaných nanostrukturovaných povrchů není úplně jednoduché nalézt ideální poměry parametrů. Mezi ty nejdůležitější patří složení elektrolytu. Množství iontů v něm obsažených ovlivňuje rychlost procesu a výslednou geometrii. Další důležitou roli hraje aplikované napětí a dále i teplota nebo čas průběhu anodické oxidace.

6.1. Elektrolyty

První publikovaná zmínka o TiO_2 porózní anodizované struktuře pochází z roku 1984, kterou připravil Assefpour-Dezfuly a jeho kolegové leptáním alkalickým peroxidem a následnou anodickou oxidací v kyselině chromové. Velký význam však mělo hlavně první použití elektrolytu s fluoridovými ionty v roce 1999, které odstartovalo, v posledních dvaceti letech, velký zájem o TiO_2 nanostrukturované povrchy, což vedlo k významnému pokroku jejich výroby.

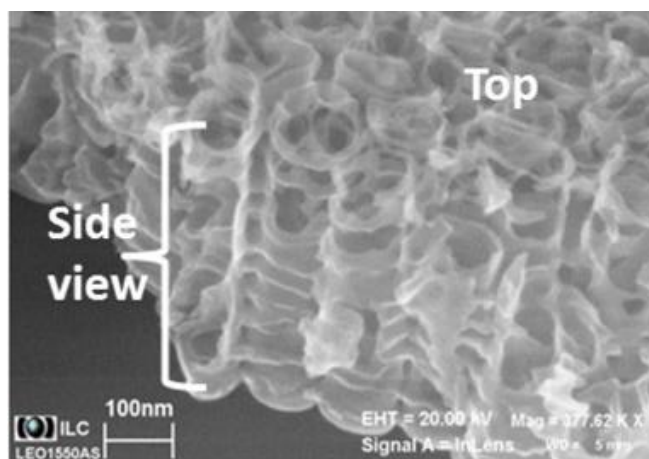
Můžeme rozlišit tři generace syntézy porózních a tubulárních povrchů v závislosti na použitých elektrolytech. První generace využívá kyselinu fluorovodíkovou, u které byla dosažena maximální délka 0,5 μm dlouhých trubiček. Druhá generace využívá elektrolyty na vodní bázi obsahující fluoridovou sůl. V těchto případech bylo dosaženo maximální délky struktur 5 μm . Třetí generace je založena na anodické oxidaci v organických elektrolytech obsahující fluoridové ionty. Při použití takového elektrolytu je možno dosáhnout od 100 do 1000 μm dlouhých respektive silných struktur. Další výhodou třetí generace je, že oproti předchozím se na strukturách nachází jen minimum artefaktů. Struktury jsou mnohem pravidelnější a hladší. Je definována i čtvrtá generace. Ta se ovšem od třetí neliší použitým elektrolytem. Jedná se o vícekrokové anodizace, které mají za následek tvorbu složitějších a více organizovaných struktur. Přehled jednotlivých generací je uveden v Tab. 1. [8,40]

Tab. 1: Vývoj elektrolytů využívaných pro výrobu TiO_2 povrchů od 1. do 4. generace [40]

Tvorba porózních a tubulárních povrchů	Elektrolyt	Délka struktury
1. Generace	vodný roztok s HF	0,5 μm
2. Generace	vodný roztok s fluoridovou solí (0,1 – 0,5 wt%)	5 μm
3. Generace	organický roztoky, fluoridová sůl (0,1 – 0,5 wt%) a malý obsah vody (0,1 – 5 wt%)	100 - 1000 μm
4. Generace	organický roztoky, fluoridová sůl (0,1 – 0,5 wt%) a malý obsah vody (0,1 – 5 wt%)	100 - 1000 μm (vícekrokové)

6.1.1. Vodné elektrolyty

Na rozdíl od anodické oxidace hliníkových struktur (AAO) je v případě výroby TiO_2 nanostrukturovaných povrchů stěžejní optimalizace rozpouštění oxidové vrstvy. Vodné elektrolyty s obsahem kyseliny fluorovodíkové byly první, které se začaly používat. Vzhledem ke kyselosti prostředí, docházelo k velkému rozpouštění bariérové vrstvy, což vedlo k tvorbě maximálně 0,5 μm dlouhých struktur. Snížením kyselosti elektrolytu za použití fluoridových solí místo kyseliny se délka struktury zvýšila na 2-4 μm . Pro vytvoření homogenní struktury je nutné i použití vhodného kationtu. Například při použití $\text{K}_2\text{SO}_4/\text{KF}$ ve vodném prostředí se vytvářejí nepravidelné struktury a sraženiny na povrchu struktury, zatímco při použití $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaF}$ nikoliv. Ve vodných elektrolytech dochází ke značnému vyvíjení kyslíku na anodě, což ovlivňuje proces růstu. Na strukturách se často objevují vlnkové artefakty patrné z Obr. 6-1 a nemusí vždy dojít k přechodu od porózní struktury v tubulární. [40]



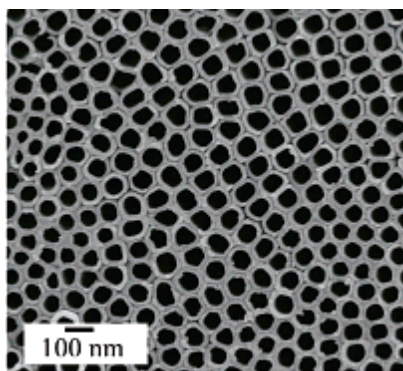
Obr. 6-1: Vlnkové artefakty na tubulární struktuře vytvořené v elektrolytu na vodní bázi [45]

6.1.2. Organické elektrolyty

Do organických elektrolytů je přidáván jistý obsah vody jako zdroj kyslíkových iontů. V organickém rozpouštědle je sice kyslík také obsažen, ale je silně vázán k molekule uhlíku jednoduchou ($\text{C}-\text{OH}$), či dvojnou ($\text{C}=\text{O}$) vazbou. Obohacení elektrolytu o kyslík lze dosáhnout také jeho stárnutím, kdy je elektrolytu umožněno absorbovat vzdušnou vlhkost. Minimální množství vody, potřebné k udržení procesu tvorby porózních a tubulárních struktur, je 0,18 objemových % (vol %).

Velký průlom v organických elektrolytech přišel s použitím viskózních elektrolytů s glycerolem, kde byl jako zdroj fluoridových iontů použit fluorid amonný (NH_4F). V tomto elektrolytu bylo dosaženo velice samoorganizovaných struktur bez artefaktů o délce 7 μm . Další optimalizací bylo použití polárních elektrolytů s etylenglykolem, který umožnil růst struktur až do délky 200 μm . Objemové procento vody se v těchto elektrolytech udržuje

pod hodnotou 5, aby se minimalizovalo chemické rozpouštění formujícího se oxidu. Použití elektrolytu se složením: 2 vol% vody, 0,3 hmotnostních % (wt%) NH_4F v etylenglykolu, vedlo oproti předchozím elektrolytům k rychlejšímu růstu vrstvy a lepšímu hexagonálnímu uspořádání. Na *Obr. 6-2* je zobrazena tubulární struktura vytvořená právě v elektrolytu s výše uvedeným složením při 60 V. Takovéto složení je dosud jedno z nejpoužívanějších při výrobě TiO_2 anodizovaných struktur. [40]



Obr. 6-2: Tubulární struktura vytvořená v organickém elektrolytu [46]

Viskozita a kationt fluoridové soli má přímý vliv na rychlost růstu a délku struktury. Nejvyužívanější jsou proto amoniové kationty, u kterých se prokázalo, že usnadňují iontovou migraci. Vzhledem k omezenému rozpouštění oxidové vrstvy v organickém elektrolytu dochází často k pokrytí tubulární struktury pórovitou vrchní vrstvou. Tuto nežádoucí vrstvu lze poté odstranit například krátkým leptáním nebo aplikací ultrazvuku v alkoholech.

Vliv na vlastnosti elektrolytu má i jeho stárnutí. Starší elektrolyt může absorbovat více vzdušné vlhkosti a mění se také jeho vodivostní schopnosti. S počtem použití a „proanodizování“ elektrolytu roste jeho elektrická vodivost. To je způsobeno především větší koncentrací TiF_6^{2-} iontů z předchozích anodizačních cyklů a také i absorbovanou vzdušnou vlhkostí. [40]

6.1.3. Vliv pH

Kyselost prostředí, ve kterém dochází k anodické oxidaci, má značný vliv na rychlost rozpouštění oxidové vrstvy. V kyselém prostředí dochází k tomuto rozpouštění mnohem rychleji než v prostředí neutrálním. Délka struktury vyvíjené v elektrolytech s nízkým pH je limitována. Maximálně lze dosáhnout délky 600 nm. To je jeden z důvodů, proč je častěji jako zdroj fluoridových iontů využíváno fluoridových solí oproti kyselině fluorovodíkové. Hladina iontů se musí kontrolovat, aby nedocházelo k nadměrnému rozpouštění. Fluoridové ionty ale musí být přítomny v dostatečném množství tak, aby se zajistil nárůst oxidové vrstvy a tvorba porózní a tubulární struktury. Koncentrace F^- iontů ovlivňuje pH roztoku. Koncentrace těchto iontů se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 0,3 do 0,5 wt%. V takových

elektrolytech je hodnota pH neutrální. Při neutrálním pH stoupá i možná dosažitelná délka vrstvy. Závislost délky struktury na koncentraci fluoridových iontů a koncentraci vody uvádí *Tab. 2*. Tubulární struktura byla syntetizována na 120 μm silné Ti fólii při 20 V. Tato tabulka ukazuje, že ideální elektrolyt obsahuje právě 2 vol% vody a 0,3 wt% NH_4F , jak bylo již zmíněno výše. [8,40,47]

Tab. 2: Délka tubulární struktury v závislosti na koncentraci vody a F^- iontů [47]

Délka nanotrubiček [μm]					
Koncentrace NH_4F	Koncentrace H_2O				
	2 vol%	3 vol%	4 vol%	5 vol%	6 vol%
0,1 wt %	10	10	2,5	2	1,2
0,2 wt %	11	11	6	3	2,2
0,3 wt %	12	9	7	6,6	4,5
0,4 wt %	3	7	9	8	5,3
0,5 wt %	8,5	10	11	9	6

6.2. Napětí

Jak bylo uvedeno výše, většinou je výroba nanostrukturovaných TiO_2 prováděna za potenciostatických podmínek, které zahrnují aplikaci konstantního napětí, a jeho průběh je monitorován pomocí měření anodického proudu. Na rozdíl od galvanostatického režimu se prokázala lepší kontrolovatelnost průběhu a morfologie struktur. Proto se galvanostatický režim, tedy aplikace konstantního proudu nevyužívá. Aplikované napětí se pohybuje v rozmezí od 5 do 30 V ve vodných elektrolytech a 10 až 60 V v elektrolytech organických. Použité napětí určuje intenzitu elektrického pole, které ovlivňuje migraci iontů přítomných v elektrolytu a tím přímo určuje průměr trubek a pórů nanostruktury. Lineární vztah mezi napětím a průměrem je pozorovatelný, až do hodnoty 60 V. Další lineární závislost existuje mezi aplikovaným napětím a tloušťkou bariérové vrstvy dna tubulárních struktur.

Linearita ovšem neplatí neomezeně. Při aplikaci napětí vyššího než 60 nebo 100 V, byl pozorován opačný jev. Po překročení kritické hodnoty, která je určena elektrolytem, již linearita neplatí a průměr může naopak se zvyšujícím se napětím dokonce klesat. Anodizační potenciál a elektrolyt má tedy přímý vliv na proudovou hustotu a na výslednou strukturu oxidové vrstvy. Velký vliv má i nastavení počáteční náběhové rampy růstu napětí. Využívá se stoupání od 1 mV/s až do 1 V/s. Takto lze získat vyšší proudovou hustotu a tím pádem delší trubičky. [8,40,48]

6.3. Čas a teplota

K dosažení maximální délky respektive tloušťky struktury je nutné, aby anodická oxidace probíhala po ideální dobu. Optimální čas je závislý na použitém elektrolytu, aplikovaném napětí, koncentraci fluorových iontů a dalších vlivech. Ve vodném prostředí jsou podmínky natolik agresivní, že vznikají struktury maximálně do několika μm . Této tloušťky je dosaženo již během několika minut od iniciace anodizačního procesu. Pro zvýšení stupně samoorganizace se ovšem doba trvání anodické oxidace pohybuje v rozmezí od 30 minut po 2 hodiny. Proces růstu v organických elektrolytech je oproti vodným mnohem pomalejší. Rozpouštění kompaktní vrstvy zde není tak výrazné. Prodloužením doby oxidaci z několika hodin až po dobu jednoho dne, lze získat tubulární struktury o délce trubičky až přes 100 μm . Při takto dlouhých průbězích se ovšem stává, že jsou struktury na některých místech nadměrně rozpuštěny. Na koncích se poté tvoří tzv. jehlovitá nebo travnatá struktura. Závislost tloušťky vrstvy na čase se blíží logaritmickému průběhu. Maximální možná dosažitelná tloušťka je samozřejmě též limitovaná tloušťkou původní titanové vrstvy. Anodická oxidace se provádí buďto na fólii, kde se její tloušťka pohybuje od několika desítek μm [49] až do stovek μm [50]. Používá se ovšem i vrstva Ti nanesená na křemíkový podklad, kde se tloušťka titanové vrstvy pohybuje ve stovkách nanometrů [51]. V souvislosti s rostoucím časem se prokázala též logaritmická závislost šířky bariérové vrstvy dna tubulární nebo porózní struktury. [8,40,48]

Obvykle se proces anodické oxidace provádí při teplotách od 20 °C do 25 °C, tedy při pokojové teplotě. Teplota však může ovlivnit rychlost rozpouštění oxidové vrstvy. Při použití nízkých teplot (okolo 8 °C) je ve vodném prostředí růst struktur inhibován. Oproti tomu při nízkých teplotách v organických elektrolytech je růst struktur příznivý. Ideální je v širokém rozsahu teplot a to už od 0 °C asi do 40 °C. Dále bylo prokázáno, že ve vodných médiích nemá teplota vliv na průměr tubulárních struktur. V organických elektrolytech však vliv má. Průměr stoupá s teplotou. Při nízkých teplotách se zvyšuje viskozita elektrolytu a tím se snižuje iontová migrace a tím pádem klesá rozpouštění oxidové vrstvy fluoridovými ionty. [40]

7. CHARAKTERIZACE POVRCHŮ

Povrchové vlastnosti nanostrukturovaných materiálů lze charakterizovat mnoha různými způsoby. Podle využití je možné zkoumat například chemické složení (pomocí spektroskopických metod), elektrické vlastnosti, optické vlastnosti (elipsometrie) nebo pevnost. Morfologii struktur je vhodné hodnotit pomocí mikroskopických metod schopných zobrazovat struktury v nanorozměrech, mezi které patří rastrovací (SEM) nebo transmisní (TEM) elektronová mikroskopie. Smáčivost je hodnocena pomocí goniometrických metod, mezi něž patří především měření kontaktního úhlu. S tím úzce souvisí i biokompatibilita nanostrukturovaného povrchu. Ta lze hodnotit adhezí a růstem buněk. [52]

7.1. Rastrovací elektronový mikroskop

Rastrovací nebo též skenovací elektronový mikroskop (SEM) byl poprvé sestaven v roce 1965 C.W.Oatleyem. K jeho vytvoření byl ovšem stěžejní dřívější vynález fotonásobiče pro detekci sekundárních elektronů. Elektronové mikroskopy prošly do současnosti velkým technologickým vývojem, což dokazuje 3MV elektronový mikroskop, který je schopen zobrazit atom. Nejčastěji se mikroskopie využívá v biologii a právě pro charakterizaci různých povrchů.

Hlavním principem zobrazení vzorku je zaměření úzkého paprsku elektronů na povrch vzorku, který s elektrony interaguje. Jedná se o nepřímou metodu, jelikož výsledný obraz je sestaven z odražených složek. Název rastrovací je odvozen od toho, že paprsek skenuje povrch po řádcích neboli rastroch. Pohled do nanosvěta je nám zprostředkován pomocí elektronů. Hlavní potřebnou vlastností, které elektrony mají, je jejich záporný náboj, což umožňuje jejich urychlování elektrickým napětím U . Kinetická energie elektronu je poté dána vztahem (11)

$$eU = \frac{1}{2}mv^2, \quad (11)$$

kde m je hmotnost elektronu ($9,109 \cdot 10^{-31}$ kg), e je náboj elektronu ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C), U je urychlovací napětí [V] a v je rychlost elektronu. Pokud rychlost dosadíme z de Broglieho rovnice, která hmotným bodům přiřazuje jisté vlnové vlastnosti (vlnovou délku- λ), dostaneme závislost vlnové délky elektronu na urychlovacím napětí, která je dána vztahem (12).

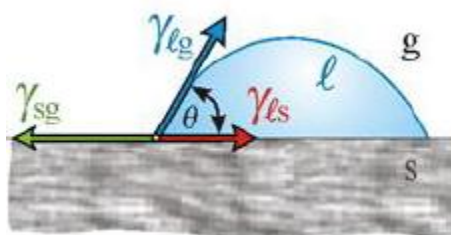
$$\lambda = \frac{1,226}{\sqrt{U}} \quad (12)$$

Při urychlovacím napětí 100 kV se elektrony pohybují přibližně poloviční rychlostí, než je rychlost světla ve vakuu.

Jednou z hlavních vlastností mikroskopů je jejich rozlišovací schopnost, která udává vzdálenost dvou bodů, které jsme schopni od sebe odlišit. Mezní rozlišovací schopnost je přibližně polovina vlnové délky použitého záření. Pro zobrazení struktur o nanorozměrech je tedy nutné využít mnohem kratších vlnových délek než je rozmezí viditelného světla (400-800 nm). Skenovací elektronový mikroskop dosahuje zvětšení až 10 000×. Aby byl svazek elektronů co možná nejúžší, je fokusován pomocí elektromagnetických čoček. Stejně jako čočky optické vykazují ovšem různé vady, což je důvod, proč v praxi nelze dosáhnout maximální teoretické rozlišovací schopnosti. Vzhledem k tomu, že jsou elektrony urychlovány ve vakuu, neměly by vzorky obsahovat příliš vody, měly by být stabilní ve vakuu, a nemělo by docházet k jejich nabíjení. Díky detekci sekundárních nebo zpětně odražených elektronů, lze získat trojrozměrný aspekt povrchu vzorku. Je to tedy ideální metoda pro charakterizaci nanomateriálů, jako jsou oxidy železa nebo povrchy tenkých filmů, které s elektrony dobře interagují. [53-55]

7.2. Měření kontaktního úhlu

Smáčivost je jednou ze základních povrchových vlastností nanomateriálů. Je důležitá především u biokompatibilních materiálů, u kterých potřebujeme, aby byl povrch co možná nejvíce hydrofilní, tedy smáčivý. Stanovování povrchového napětí pro rozhraní pevná látka-vzduch (γ_{sg}) a kapalina-pevná látka (γ_{ls}) je důležité při řešení široké škály problémů v teoretické a aplikované vědě. Povrchové napětí zahrnující pevnou složku lze ale měřit jen velice obtížně, proto se využívá metod nepřímých. Existuje několik odlišných metod odhadu povrchového napětí pevných látek zahrnující: přímé měření síly, kontaktní úhel, sedimentace částic a několik dalších. Nejjednodušší a jedna z nejvyužívanějších metod je právě měření kontaktního úhlu. Při měření uvažujeme soustavu styku tří fází, z nichž dvě jsou kondenzované a jedna plynná. V praxi se pro jeho zjištění používá kapka kapaliny na zkoumaném pevném povrchu v kontaktu se vzduchem. Kontaktní úhel θ je úhel, který svírá tečna k povrchu kapky kapaliny (γ_{lg}) a základna pevné látky (γ_{ls}). Jednotlivé tečné vektory pro výpočet jsou znázorněny na Obr. 7-1. [52,56]



Obr. 7-1: Znázornění úhlů využívaných pro měření kontaktního úhlu [52]

Při umístění kapaliny na povrch mohou nastat zpravidla dva případy. Podle velikosti úhlu smáčení θ rozlišujeme kapaliny, které tuhý povrch smáčejí ($0 < \theta < 90^\circ$) nebo nesmáčejí ($\theta > 90^\circ$). Je-li povrch tuhé látky smáčen kapalinou, označujeme jej jako lyofilní, v případě vody hydrofilní. Nesmáčivý povrch je označován jako lyofobní nebo hydrofobní v případě vody. Další možnost nastane, když $\theta = 0^\circ$. Takovýto povrch označujeme jako dokonale smáčivý.[52] Možnost odhadu povrchového napětí z kontaktního úhlu je možný díky Youngově rovnici (13), která definuje rovnovážný stav povrchových napětí rozmezí třech fází (s-pevná, l-kapalná, g-plynná).

$$\gamma_{lg} \cos \theta_Y = \gamma_{sg} - \gamma_{sl}, \quad (13)$$

kde θ_Y je označován jako Youngův kontaktní úhel.[56]

II. CÍLE PRÁCE

1. Návrh a výroba 3D titanových nanostrukturovaných a nanoporézních povrchů pomocí šablony z oxidu hlinitého (AAO) a přímé potenciostatické anodické oxidace titanové vrstvy
2. Testování vlivu tloušťky původní titanové vrstvy, aplikovaného anodizačního potenciálu a složení elektrolytu na morfologické a strukturální vlastnosti nanostruktur
3. Charakterizace vzniklých nanostrukturovaných povrchů pomocí SEM mikroskopu a studium smáčivosti pomocí metody měření kontaktního úhlu.
4. Testování a srovnání biokompatibility TiO_2 nanopovrchů u MG-63 buněk

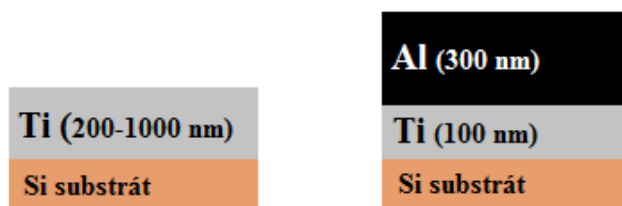
III. PRAKTICKÁ ČÁST

8. METODY

8.1. Výroba nanostrukturovaných povrchů

Jak bylo zmíněno v teoretické části, existuje více přístupů pro výrobu nanostrukturovaných TiO_2 povrchů. V této práci byly všechny struktury vytvořeny pomocí potenciostatické anodické oxidace. Porózní a tubulární struktury byly vytvořeny přímou metodou. Anodické napětí bylo aplikováno na různé silné vrstvy titanu (od 200 nm do 1 μm). Ten byl připraven naprášením na křemíkovou nosnou desku.

Tyčinkovité struktury a nanotečky byly vytvořeny anodickou oxidací za pomoci AAO, tedy s využitím aluminové šablony. V tomto případě byl použit opět křemíkový substrát, ovšem vrstva titanu byla pouze 100 nm a na něm bylo nanесeno ještě 300nm hliníku, který je využit pro vytvoření šablony. Využité kovové vrstvy naprášené na křemíkovém substrátu jsou znázorněny na Obr. 8-1.



Obr. 8-1: Použité kovové vrstvy na křemíkovém substrátu

Všechny vzorky o velikosti přibližně 1 cm^2 byly před aplikací anodického napětí ponechány 10 minut v isopropylalkoholu ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, čistý, Penta, CZ), následně opláchnuty miliporovanou vodou (Millipore Corp., USA, 18,2 $M\Omega$) a důkladně osušeny stlačeným vzduchem. Před započítím anodické oxidace byly proměřeny vlastnosti elektrolytu, který byl následně použit. Proměřila se jeho vodivost, pH a teplota.

Pro tvorbu struktur byly využity dvě odlišné aparatury. V některých případech byla využita pouze kádinka, ve které byl příslušný elektrolyt. Vzorek byl ponořen do elektrolytu a přiveden na kladný pól, tak aby tvořil anodu. Jako protější elektroda (katoda) byla využita kovová mřížka. Jako druhá byla využita aparatura s řízeným průtokem, kde elektrolyt cirkuluje kolem vzorku skrze hlavu se zlatou elektrodou. Průměr hlavy je 9 mm. Výhodou této aparatury je stabilnější proudová hustota na celém povrchu vzorku a výměna elektrolytu u povrchu vzorku. Ve všech případech byl pro lepší kontrolu monitorován průběh anodického proudu.

8.1.1. Příprava porézních a tubulárních struktur

V případě tvorby porézních a tubulárních struktur přímou metodou, bylo vždy aplikováno stabilní napětí v rozmezí od 10 do 120 V. Tyto struktury byly formovány v elektrolytech na organické bázi, konkrétně na etylenglykolu ($\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$, čistý, *Penta*, *CZ*), které obsahovaly různý poměr fluoridu amonného (NH_4HF , *Riedel-de Hoën*) a miliporované vody (H_2O). Složení použitých elektrolytů je zobrazeno v *Tab. 3*. Anodická oxidace probíhala při pokojové teplotě.

Tab. 3: Složení elektrolytů využitých pro výrobu porézních a tubulárních struktur

Využití	Objem elektrolytu [ml]	NH_4F [wt %]	Hmotnost NH_4F [g]	H_2O [vol %]	Objem H_2O [ml]
Porézní struktury	100	0,3	0,33	2	2
Vliv koncentrace F^- na tubulární strukturu	100	1,2	1,35	2	2
	100	1,4	1,58	2	2
	100	1,6	1,81	2	2
Vliv koncentrace H_2O na tubulární strukturu	50	1,2	0,675	-	-
	$50 + V_{\text{H}_2\text{O}}$	1,2	0,675	0,3	0,15
	$50 + V_{\text{H}_2\text{O}}$	1,2	0,675	0,5	0,25
	$50 + V_{\text{H}_2\text{O}}$	1,2	0,675	1	0,50

Struktury se vytváří tak, jak bylo popsáno v kapitole 5.1.1. Při výrobě tubulárních struktur vytvářených v kádince byla oxidace prováděna za stálého míchání elektrolytu. Při výrobě tubulárních struktur oproti strukturám porézním, byla aplikována náběhová hrana aplikovaného napětí s gradientem 1 V/s. Po ukončení procesu byly vzorky opět opláchnuty miliporovanou vodou a důkladně osušeny.

8.1.2. Příprava nanotyčinek a nanoteček

Tyčinkovité struktury a nanotečky byly vytvářeny za asistence AAO. V těchto případech byl použit elektrolyt $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny šťavelové ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,5%, *Penta*, *CZ*). Další rozdíl oproti předchozím strukturám je v nutnosti chlazení. Proces tvorby probíhal při chlazení na 10°C v aparatuře s řízeným průtokem. Při formování tyčinkovité struktury je nutné použití dvou napětí. Aluminová pórovitá šablona byla vytvářena při napětí 40 V. Proces tvorby šablony probíhal obdobně jako při anodické oxidaci titanu. Takto se vytvořila šablona z Al_2O_3 . Poté bylo nutné napětí zvýšit, aby došlo k průrazu bariérové vrstvy na dně aluminy. Proto se napětí zvyšovalo na 80 V s náběžnou hranou 0,2 V/s, což z hodnoty 40 V na 80 V trvá 200 sekund. Při zvyšování napětí dochází právě k průrazu bariérové vrstvy aluminy a tím se umožní prostoupení TiO_2 skrze šablonu a růst tyčinek.

Při tvorbě nanoteček byl postup obdobný, až na aplikované napětí. Nanotečky byly vytvářeny při stabilním napětí 40 V po dobu 1000 sekund, aby došlo k samovolnému prostoupení aluminou, ovšem jen do limitované výšky. Aluminová šablona byla poté leptána v leptadle, které je složeno z oxidu chromového (CrO_3 , 99%, *Penta, CZ*), kyseliny fosforečné (H_3PO_4 , 98%, *Penta, CZ*) a vody. Leptání probíhalo po dobu 5 minut při 55 °C. Aluminová šablona byla odstraněna pomocí leptadla při teplotě 55 °C. Vzorky byly v leptacím roztoku ponechány buď 10, 5 a nebo 4 minuty. Následně byly dvakrát opláchnuty v isopropylalkoholu a opatrně osušeny stlačeným vzduchem.

Všechny vzorky byly charakterizovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Smáčivost vzorků využitých pro studium chování buněk byla poté změřena pomocí měření kontaktního úhlu.

8.2. Interakce buněk s nanostrukturovaným TiO_2 povrchem

Interakce buněk byla zkoumána pouze pro struktury vytvořené pomocí aluminové šablony (nanotyčinky a nanotečky). Pro lepší hodnocení byla odezva buněk na tyto struktury porovnávána s kompaktní nestrukturovanou vrstvou TiO_2 , která byla vytvořena anodickou oxidací v elektrolytu bez přídavku NH_4F . Pro testování povrchů byla využita buněčná linie MG-63. Tato linie je získána z osteosarkomu, což je nádor kostní tkáně. Nicméně jsou tyto buňky používány jako modelová linie s chováním podobným buňkám osteoblastů.

8.2.1. Kultivace MG-63 buněk

Buňky jsou kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO_2 v kultivačních miskách a udržovány v DMEM mediu s přídavkem 10 % FBS (fetální hovězí sérum, *Sigma*), 1 % ATB (penicilin, streptomycin, *Sigma*), 1 % L-glutaminu (*Sigma*). Buňky jsou před nanosením na nanostrukturované povrchy pasážovány, tj. převedeny do suspenze metodou trypsinizace. Postup pasážování buněk do 25 cm^2 kultivační nádoby byl následující. Buňky byly vyjmuty z inkubátoru a zkontrolovány pod mikroskopem. Poté bylo odsáto kultivační médium a buňky byly omyty PBS pufrem. Po odsátí pufru byl k buňkám přidán 1 ml trypsinu (0,25% trypsin + EDTA, *Sigma*), tak aby pokrýval celou plochu kultivační nádoby. Kultivační láhev s obsahem trypsinu byla poté 5 minut inkubována. Po trypsinizaci byly buňky lehce sklepany ze dna tak, aby byly buňky uvolněny do roztoku. Poté byl přidán 1 ml média. Médium s buňkami bylo převedeno do centrifugační zkumavky a centrifugováno 5 minut na 2000 otáček/min. Poté byl odstraněn supernatant a k peletu buněk byl přidán 1 ml média, ve kterém byly buňky opatrně resuspendovány. Počet buněk v 1 ml byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Do nové 25 cm^2 kultivační nádoby bylo poté převedeno 10^5 buněk a doplněno do 5 ml médiem. Buňky byly poté opět zkontrolovány pod mikroskopem a přeneseny do inkubátoru.

Před nasazením buněk na nanostrukturované povrchy byly tyto vzorky umyty etanolem a sterilizovány 10 min pod UV zářením. Vzorky byly umístěny do Petriho misky a poté byly

osázeny přidavkem 1,5 ml buněčné suspenze obsahující 10^5 buněk. Misky se vzorky byly umístěny do inkubátoru při 37°C na dobu, dle experimentu.

8.2.2. Studium adheze buněk na TiO₂ nanostrukturách

Adheze buněk byla sledována pomocí světelné mikroskopie. Buňky byly nanесeny na vzorky v koncentraci 10^5 buněk/plochu a posléze ponechány při výše zmíněných kultivačních podmínkách. Adheze buněk byla kontrolována po 5 a 24 hodinách. Každý vzorek byl nasnímaný na více místech a poté byl vyhodnocen průměrný počet buněk na povrchu. Hodnotil se počet plně adherovaných buněk a buněk jevící kulatou morfologií.

8.2.3. Fluorescenční značení aktinu

Aktin je jeden ze strukturních proteinů, který tvoří skelet buňky v podobě polymerních vláken zvaných mikrofilamenta. Je jednou ze složek buňky, kterou lze velmi dobře fluorescenčně značit. V našem případě byl použit ActinGreen od firmy *Molecular Probes*. Morfologie buněk na povrchu nanostruktur byla sledována po 24 hodinové kultivaci. Buňky byly třikrát opláchnuty PBS pufrem. Poté zafixovány 3% paraformaldehydem rozpuštěným v PBS. Opět byl fixační roztok ponechán po dobu 20 minut v inkubátoru při 37 °C a posléze třikrát opláchnut fosfátovým pufrem. Po fixaci buněk bylo nutné narušit membránu buňky pomocí 0,5% Triton X-100. Následovalo již samotné barvení výše zmíněným fluorescenčním barvivem. Koncentrace připraveného barvicího roztoku byla podle pokynů výrobce dvě kapky na mililitr média. Barvivo se ponechalo 30 minut navazovat. Po reakci barviva byly buňky opláchnuty PBS. Zobrazení probíhalo při excitační vlnové délce fluoresceinu 488 nm. Emisní spektrum barviva je poté v zelené oblasti.

8.2.4. SEM mikroskopie

Pro zhodnocení morfologie buněk, bylo využito také rastrovacího elektronového mikroskopu. Opět bylo nasazeno 10^5 buněk/plochu. Jako v případě fluorescenčního značení aktinu, i v tomto případě byla struktura buněk na povrchu nanostruktur sledována po 24 hodinové kultivaci. Buňky byly nejdříve třikrát omyty PBS pufrem. Následně byla provedena fixace pomocí 2,5 % glutaraldehydu rozpuštěného také v PBS. Fixační roztok byl ponechán po dobu 20 minut v inkubátoru při teplotě 37 °C. Po této inkubaci byl fixační roztok odsán a buňky byly opět třikrát opláchnuty PBS. Vzhledem k požadavkům na vzorky, které mohou být zobrazeny pomocí SEM, bylo nutné ještě buňky dehydratovat. Tento proces byl prováděn pomocí koncentrační řady roztoků etanolu. Konkrétně se jednalo o 50 %, 70 %, 80 %, 90 % a 100 % roztoky etanolu. V každém z roztoků koncentrační řady byly vzorky ponechány po dobu 10 minut. Až po této dehydrataci byly buňky na nanostrukturovaných površích podrobeny SEM snímání.

8.2.5. Studium proliferace buněk

Proliferace buněk byla testována pomocí MTT testu (*Merck*). Tento test je založen na redukci žluté tetrazoliové soli na modré krystalky formazanu, který je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Množství vzniklého formazanu je poté přímo úměrné koncentraci živých buněk.

Proliferace na površích byla sledována po 4, 24, 48 a 72 hodinách kultivace. Po dané době kultivace bylo vyměněno médium a přidáno 50 μl MTT (1mg/ml v PBS) ke 150 μl média. Buňky byly s MTT inkubovány po dobu 4 hodin v inkubátoru. Po tuto dobu se 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid přeměňuje v buňkách na nerozpustné krystalky formazanu. Poté bylo médium odsáto a bylo přidáno 200 μl 10% SDS (dodecylsulfát sodný), který krystalky formazanu rozpustil. Fialově zbarvený roztok o objemu 200 μl byl převeden do 96-jamkové destičky a byly změřeny absorbance při vlnové délce 570 nm.[57] K měření absorbance byl použit UV/VIS spektrofotometr od firmy *Beckman coulter*.

Pro lepší interpretaci výsledků byly změřené absorbance převedeny na počet buněk pomocí kalibrační křivky. Křivka byla vytvořena pomocí změřených absorbancí přeměněného formazanu po 4 hodinách u řady roztoků se známou koncentrací buněk při 570 nm. Jednotlivé koncentrace byly 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 a 10^5 buněk/plochu. Proměřen byl také samotný SDS roztok jako kontrolní vzorek. Hodnotu absorbance tohoto kontrolního vzorku je poté nutné odečíst od všech naměřených hodnot, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.

8.2.6. Stanovení aktivity alkalické fosfatázy

Aktivita alkalické fosfatázy (ALP) jako markeru proliferace a diferenciací buněk byla měřena po 48 a 72 hodinách kultivace. Aktivita tohoto enzymu byla hodnocena pomocí kitu od firmy *BioVision*. Celý proces je založen na defosforylaci p-nitrofenyl fosfátu (pNPP) na žlutý produkt p-nitrofenol (pNP). Absorbance je poté měřena při 405 nm a odpovídá koncentraci vzniklého produktu. Pro vyhodnocení bylo nutné nejdříve vytvořit kalibrační křivku, kde ALP enzym byl přímo součástí kitu. Aktivita alkalické fosfatázy byla přepočtena podle rovnice uvedené níže.

Po příslušné době kultivace byly nanostrukturované povrchy s buňkami vyjmuty z inkubátoru a opláchnuty PBS pufrem. Buňky bylo nutné zlyzovat pomocí 100 μl lyzačního pufru. Po rozrušení buněk byl pufr s buňkami převeden do zkumavek a nechal se centrifugovat 5 minut při 2000 otáčkách/min. 80 μl supernatantu bylo poté převedeno do 96-jamkové destičky. Posléze bylo přidáno 50 μl pNPP. Roztoky byly promíseny opatrným sklepáním. Jednotlivé složky byly ponechány reagovat 4 hodiny ve tmě při pokojové teplotě. Po této době byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm pomocí UV/VIS spektrofotometru od firmy *Beckman coulter*. Při všech měřeních byl hodnocen i kontrolní vzorek.

Koncentrační řada pro vytvoření kalibrační křivky byla vytvořena následujícím postupem. Nejdříve bylo zředěno 40 μl 5 mM roztoku pNPP s 160 μl pufru. Tím nám vznikl 1mM pNPP standard. Do 96-jamkové destičky bylo v duplikaci nanášeno 0, 4, 8, 12, 16, 20 nmol/jamku standardního roztoku pNPP. Následně byly jednotlivé jamky doplněny do objemu 120 μl pufrům. Do každé jamky s pNPP roztokem bylo následně přidáno 10 μl ALP enzymu. Roztoky byly důkladně promíseny několikanásobným nasátím do mikropipety. Reakce ALP enzymu s pNPP probíhala po dobu jedné hodiny při teplotě 25 °C ve tmě. Po této době byla reakce zastavena přidáním 20 μl stop roztoku. Absorbance žlutého produktu po reakci se měřila při 405 nm za teploty 24 °C.

Aktivita alkalické fosfatázy (U/ml) je vyhodnocována pomocí jednoduchého přepočtu podle rovnice (14).

$$ALP \text{ aktivita} = \frac{A/T}{V}, \quad (14)$$

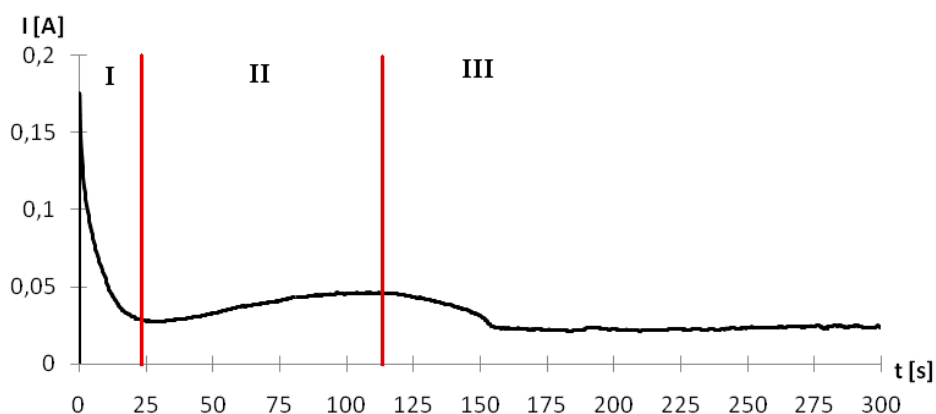
kde A je množství přeměněného pNP [μmol], které je vypočteno z kalibrační křivky. T je čas reakce v minutách a V označuje objem vzorku, který byl přidán v mililitrech. V našem případě byl čas reakce T vždy 240 minut (4 hodiny) a objem vzorku V byl 0,08 ml.[29]

9. VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1. Výroba nanostrukturovaných povrchů

9.1.1. Porézní struktury

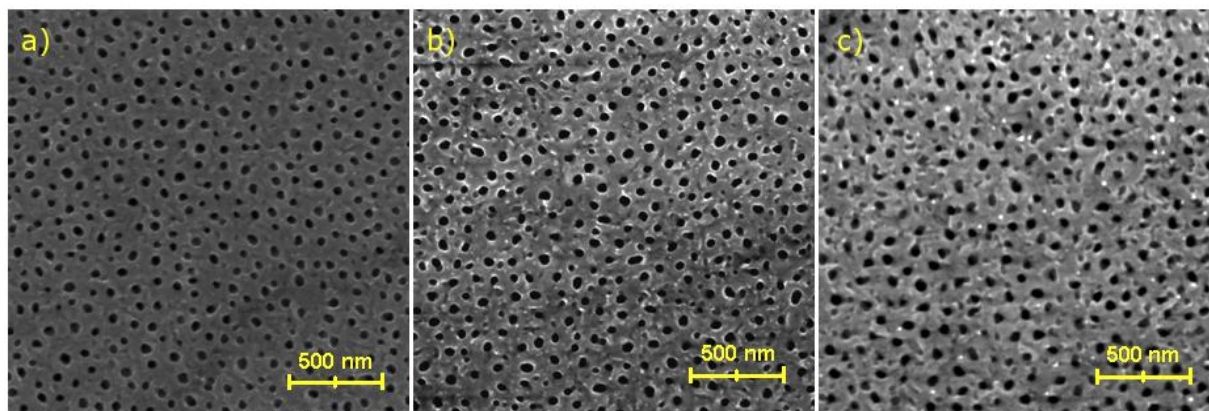
Postup výroby porézních struktur byl popsán výše. Na porézní struktury byl ve všech případech použit elektrolyt s obsahem 0,3 wt% NH_4F a 2 vol% H_2O v etylenglykolu. Jak již bylo zmíněno, takovéto složení elektrolytu je jedno z nejvyužívanějších při anodické oxidaci titanových vrstev. Vzorový průběh anodického proudu je zobrazen na *Obr. 9-1* níže. Jsou zde patrné všechny tři fáze průběhu tak, jak byly popsány v kapitole 5.1.1.



Obr. 9-1: Vzorová proudová charakteristika anodické oxidace výroby porézních struktur

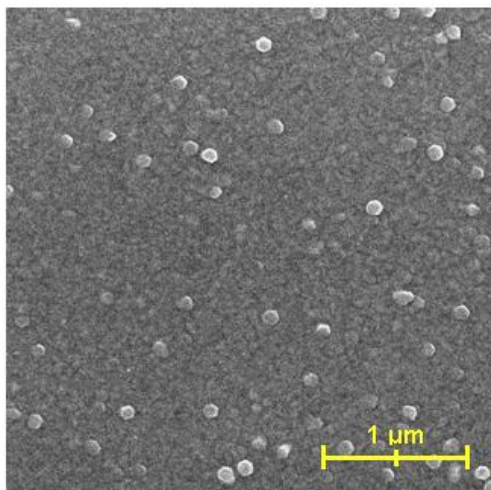
Porézní struktury s velkým průměrem pórů

Vzorky s velkými póry byly vytvářeny v aparatuře s kádinkou. Byla použita vrstva titanu o tloušťce 1 μm a napětí 40, 50 a 60 V. Vodivost elektrolytu byla 727 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 7,3 a teplota 23 $^{\circ}\text{C}$. Na *Obr. 9-2* je zobrazena jejich SEM charakterizace.



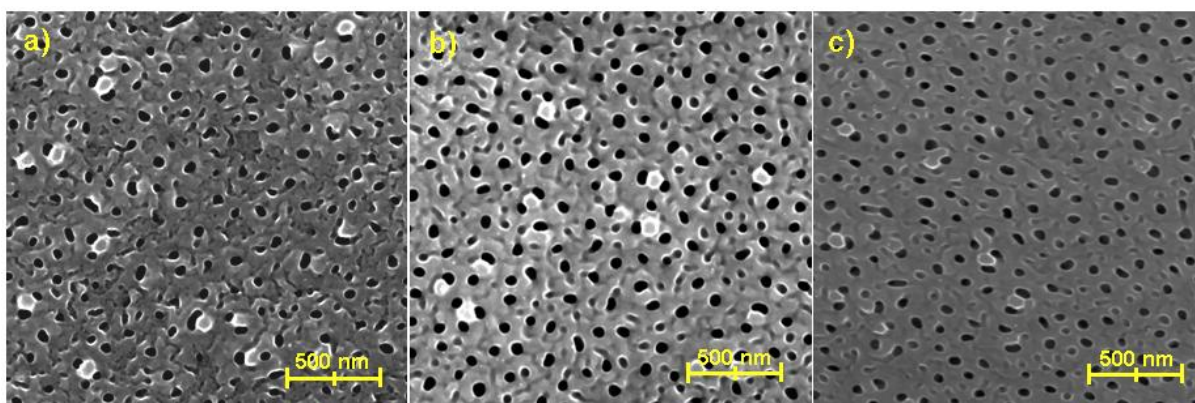
Obr. 9-2: Porézní struktury vytvořené na 1 μm Ti při a) 40 V, b) 50 V, c) 60 V

Na další vzorky bylo aplikováno napětí, 80, 100 a 120 V. Toto napětí bylo aplikováno na vrstvu vytvořenou třemi postupně naprášenými vrstvami titanu po 300 nm. Ve výsledku tedy tvořila titanová vrstva 900 nm. Tento naprášený povrch ovšem obsahuje artefakty v podobě zrn o průměrné velikosti 100 nm, jak je vidět z *Obr. 9-3*.



Obr. 9-3: Naprášená vrstva Ti 3×300 nm s nežádoucími zrnovými artefakty

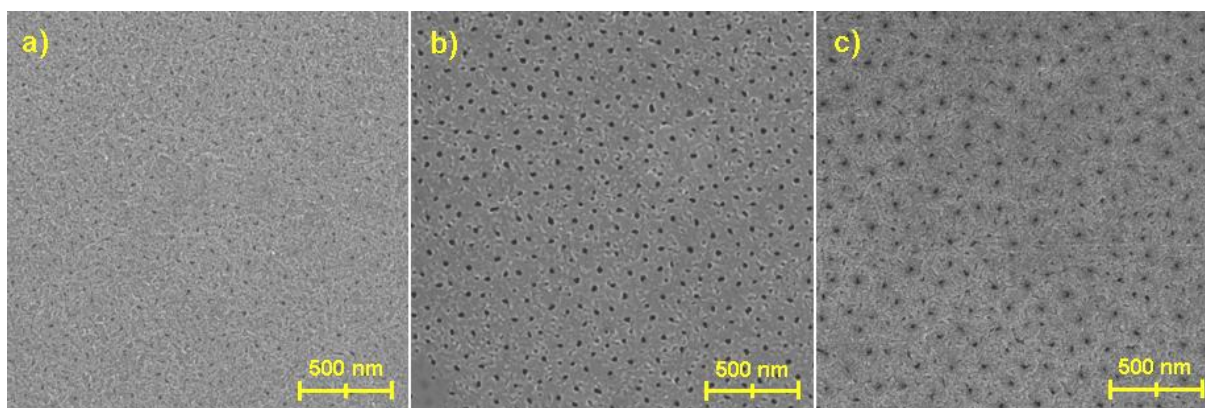
Kvůli těmto nerovnostem nelze použít takovou vrstvu k přípravě tubulárních struktur. Nerovnoměrný povrch totiž způsobí nerovnoměrné působení iontů v elektrolytu. Proto lze na této vrstvě dosáhnout pouze porézní struktury. Složení elektrolytu pro tyto vzorky bylo shodné jako v předchozím případě. Jeho vodivost byla 802 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 7,16 a teplota 23 $^{\circ}\text{C}$. SEM charakterizace povrchu vzorků je zobrazena na *Obr. 9-4*.



Obr. 9-4: Porézní struktury vytvořené na 3×300 nm vrstvě Ti při a) 80 V, b) 100 V, c) 120 V

Porézní struktury s malým průměrem pórů

Tloušťka titanové vrstvy vzorků byla oproti předchozím případům pouze 200 nm. Postup výroby byl popsán výše a liší se oproti předchozímu jen v použité aparatuře, jejíž výhody byly též zmíněny. Průměr anodizační hlavy je 9 mm, takže ve výsledku dostaneme nanostrukturovanou plochu 63,62 mm². Na vzorky bylo aplikováno napětí 40, 50 a 60 V. Elektrolyt byl opět složen z 0,3 wt% NH₄F, 2 vol% H₂O v etylenglykolu. Vodivost elektrolytu byla v tomto případě 773 μS/cm, pH 7,32 a teplota 23,5 °C. SEM charakterizace jednotlivých vzorků je uvedena níže na Obr. 9-5.



Obr. 9-5: Porézní struktury vytvořené na 200 nm Ti při a) 40 V, b) 50 V, c) 60 V

Vliv napětí a původní tloušťky Ti u porézních struktur

Napětí aplikované při anodické oxidaci by mělo mít vliv na průměr otvorů struktury. Podle literatury [19] roste průměr otvorů lineárně s aplikovaným napětím. Vzhledem k tomu, že mnou vyrobené porézní struktury vytvářené v aparatuře s kádinkou, které jsou popsány v této kapitole, jsou pouze vrchní vrstvy nedokonale vytvořených tubulárních struktur, tato závislost se na ně příliš nevztahuje, což je patrné z Tab. 4 níže. Hodnoty, ze kterých jsou průměry počítány, jsou uvedeny v příloze v Tab. 7.

Tab. 4: Přehled průměrných velikostí pórů vytvořených nanoporézních struktur

Ti [nm]	1000			900			200		
použité napětí [V]	40	50	60	80	100	120	40	50	60
průměr pórů [nm]	54	52	53	55	58	53	14	23	28
směrodatná odchylka	2	5	7	7	4	4	2	3	5

Ze SEM charakterizací také můžeme vidět, že rozmístění pórů není příliš pravidelné. Rozdíly velikosti pórů mezi vzorkem vytvářeným při 40 V a 120 V jsou jen nepatrné. V literatuře [19] je též uvedeno, že linearita závislosti platí pouze v rozmezí od 10 do 60 V, zatímco zde byly

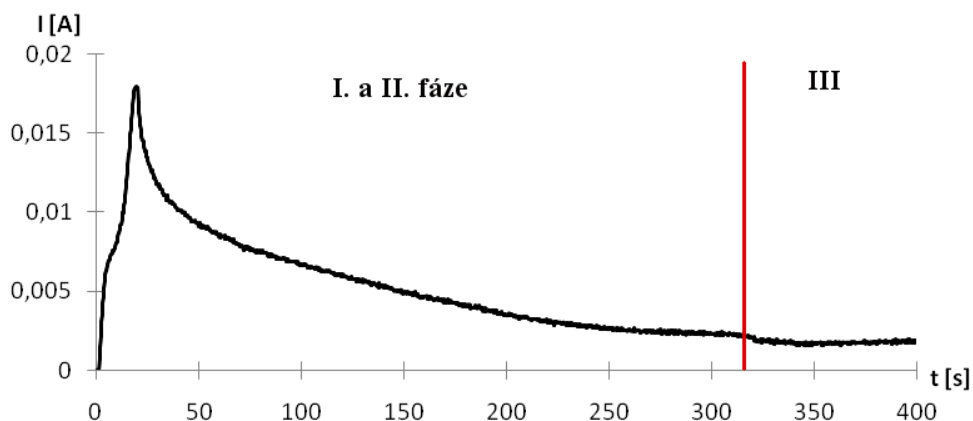
použity napětí od 40 do 120 V, což značně převyšuje publikovaný limit. Dokazuje to tedy fakt, že po překročení mezní hodnoty napětí, dané elektrolytem, neplatí lineární závislost průměru otvorů na napětí. Další vliv mohl hrát také nerovnoměrný povrch původní titanové vrstvy a tedy nestejné působení elektrolytu po celé ploše vzorku.

U struktur vytvářených v aparatuře s řízeným průtokem je pozorovatelný jistý vývoj. Z Obr. 9-5 je dobře patrné, že se vzrůstajícím napětím roste také velikost pórů struktury. Vliv napětí na velikost pórů je pozorovatelný díky použité aparatuře, která zajišťuje stabilnější proudový průtok a také díky rovnoměrně naprášené původní vrstvě titanu oproti předchozím vzorkům s nepravidelnostmi původní titanové vrstvy.

Dále můžeme pozorovat vliv původní vrstvy titanu na vytvořené porézní struktury. Jak je patrné z Obr. 9-2 a Obr. 9-5, kde byl použit elektrolyt o shodném složení a bylo vyvíjeno stejné napětí a to 40, 50 a 60 V. V případě vysoké vrstvy titanu o tloušťce 1 μm bylo dosaženo o mnoho větších otvorů ve struktuře než v případě vrstvy o tloušťce 200 nm. Vliv na výsledné struktury by ovšem mohla mít i použitá aparatura.

9.1.2. Tubulární struktury

Všechny tubulární struktury byly vytvářeny v kádince. Vždy bylo aplikováno napětí s náběžnou hranou s gradientem 1 V/s. Tloušťka původní titanové vrstvy byla ve všech případech 500 nm. Elektrolyt byl v průběhu anodické oxidace neustále míchán a byl sledován průběh anodického proudu. Průběh proudu při tvorbě tubulárních struktur je trochu odlišná, než v případě porézních povrchů. Vzorový průběh anodického proudu je zobrazen níže na Obr. 9-6.



Obr. 9-6: Vzorová proudová charakteristika anodické oxidace při výrobě tubulárních struktur

Z tohoto vzorového průběhu můžeme pozorovat, že fáze tvorby struktury jsou v tomto případě jen těžko rozeznatelné. K poklesu proudu, tedy proražení bariérové vrstvy dochází zřejmě již v náběžné hraně. Se zvyšujícím se napětím ovšem stoupá i proud. Můžeme vidět záchvěv v náběžné hraně, kterým zřejmě končí první fáze tvorby struktury, avšak proud

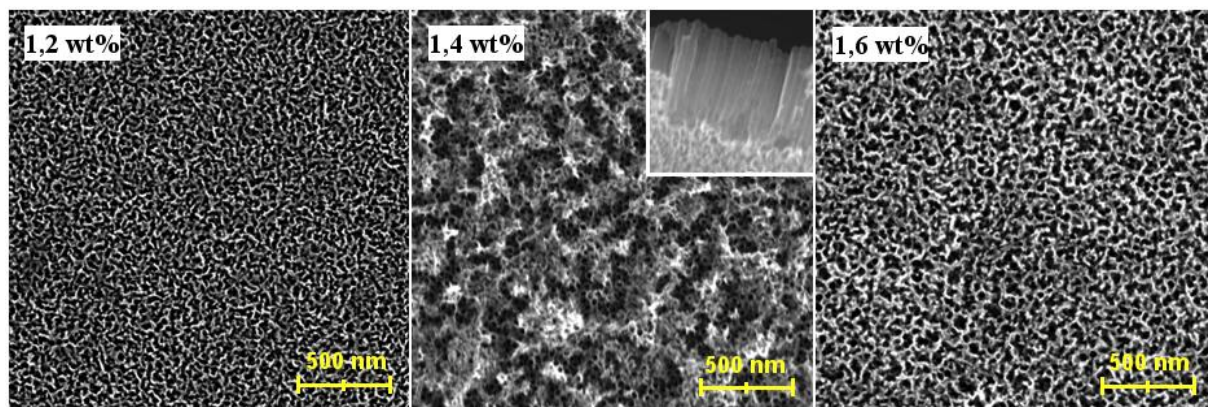
neustále stoupá. Po dosažení maxima v čase 20 sekund dochází k dosažení konstantního napětí 20 V. Od tohoto okamžiku je napětí udržováno na této hodnotě. Z grafu je patrné, že proud od tohoto okamžiku pouze klesá, jak se formují stále širší a vyšší tubulární struktury. Na konci je však vždy patrný pokles na minimum, který značí konec procesu anodické oxidace.

Vliv koncentrace fluoridových iontů v elektrolytu

Všechny použité elektrolyty byly na organické bázi, tedy na základě etylenglykolu. Procento vody v těchto případech bylo stabilně 2 vol%. Lišil se obsah NH_4F , který je zdrojem fluoridových iontů. Hmotnostní koncentrace NH_4F byla od 1,2 do 1,6 wt%. Parametry před použitím elektrolytů jsou poté pro přehlednost vypsány v *Tab. 5*. Vzorky byly anodizovány při stabilním napětí 20 V s náběžnou hranou 1 V/s. Jejich SEM je patrné na *Obr. 9-7*.

Tab. 5: Vlastnosti elektrolytů s různou koncentrací F^- iontů a konstantní H_2O

Hmotnostní % NH_4F	Vodivost [mS/cm]	pH
1,2	2,14	6,76
1,4	2,43	6,82
1,6	2,58	6,71



Obr. 9-7: Vliv koncentrace NH_4F v elektrolytu na tubulární struktury za konstantního množství vody v elektrolytu

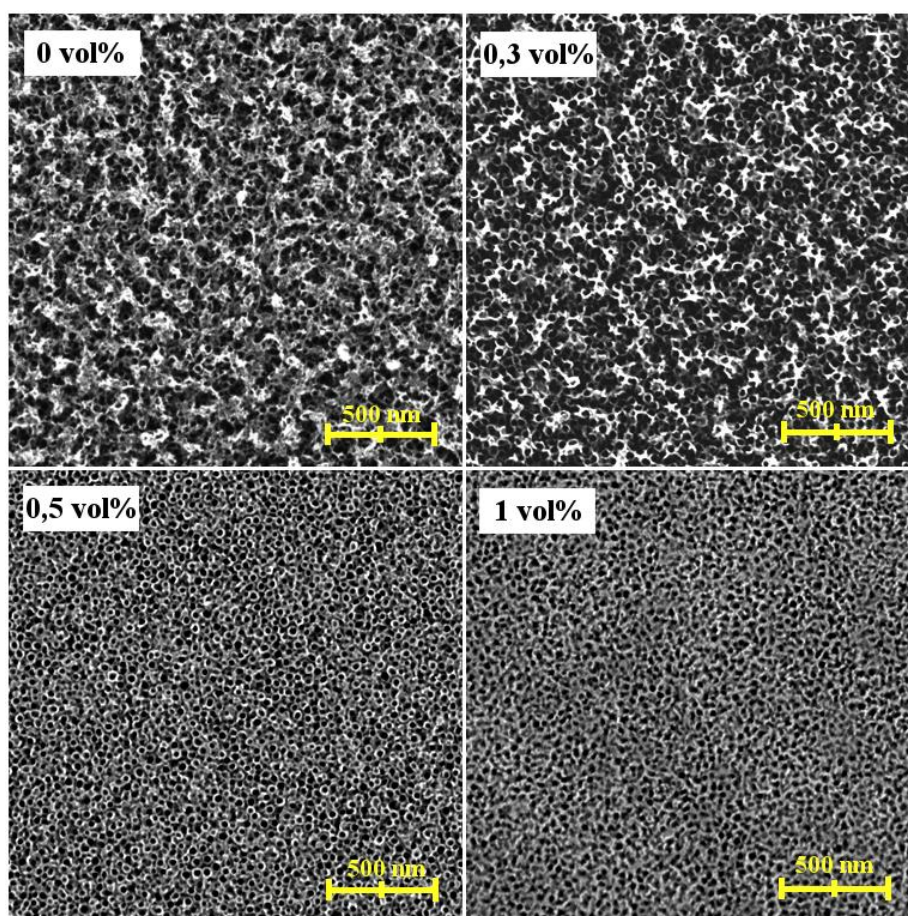
Můžeme pozorovat, že složení s 1,2 wt% NH_4F a 2 vol% vody, které je publikováno jako ideální pro tvorbu trubičkovité struktury u silnějších původních vrstev titanu v podobě fólií, není ideálním složením při původní tloušťce 500 nm. Lepší výsledky byly dosaženy s obsahem 1,4 wt%. Ovšem ani v tomto případě nebylo dosaženo ideálního stavu. Je patrné, že u všech struktur je povrch pokryt nerovnoměrnou vrstvou oxidu.

Vliv koncentrace vody v elektrolytu

V tomto případě byly použity elektrolyty se stabilní koncentrací fluoridových iontů. Tato koncentrace činila 1,2 wt% NH_4F . Tloušťka titanové vrstvy byla jako u testování vlivu koncentrace fluoridových iontů 500 nm. Obsah vody v elektrolytu se pohyboval od 0 do 2 vol%. Elektrolyty byly v průběhu oxidace neustále míchány. Vlastnosti jednotlivých elektrolytů před použitím jsou vypsány v *Tab. 6*. Na všechny vzorky bylo aplikováno stabilní napětí 20 V s náběžnou hranou 1 V/s. SEM charakterizace jednotlivých vzorků jsou poté zobrazeny na *Obr. 9-8*.

Tab. 6: Vlastnosti elektrolytů s různou koncentrací vody a konstantní koncentrací NH_4F

Objemové % H_2O	Vodivost [mS/cm]	pH
0	2,16	6,93
0,3	2,21	6,97
0,5	2,23	7,01
1,0	2,31	7,03



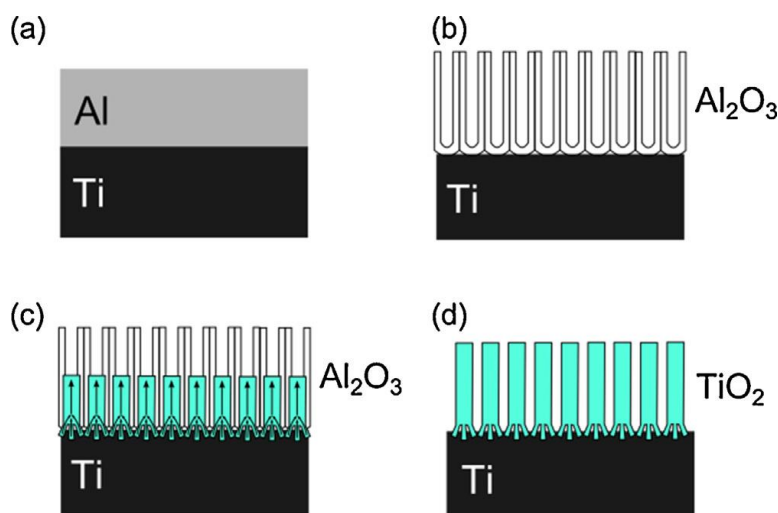
Obr. 9-8: Vliv koncentrace H_2O v elektrolytu na tubulární struktury při konstantní koncentraci NH_4F

Koncentrace 1,2 wt% fluoridu amonného byla zvolena s ohledem na nejčastěji publikované složení elektrolytu v době, kdy ještě nebyly známy výsledky předchozího zkoumání vlivu koncentrace fluoridových iontů. Povrchy byly pomocí SEM charakterizovány naráz.

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při 0,5 vol% vody. Ovšem už i struktura vytvořená v elektrolytu bez vody obsahuje viditelné trubičky. Tento vzorek však obsahuje vrchní nepravidelnosti. Obdobně je tomu i při koncentraci 0,3 vol%. Při větších koncentracích už byl elektrolyt příliš agresivní, což je vidět u pravého spodního snímku v *Obr. 9-8*.

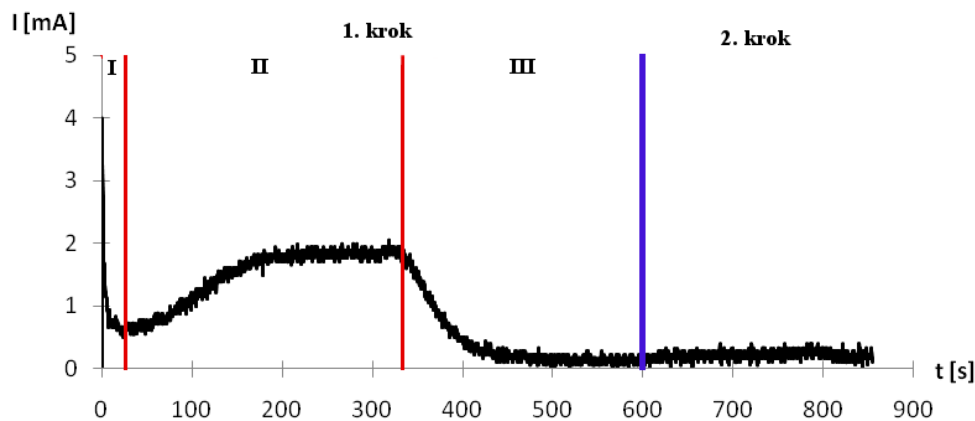
9.1.3. Tyčinkovité struktury

Tyčinkovité struktury byly vytvořeny dvoukrokovou anodickou oxidací s pomocí aluminové šablony. Schematické zobrazení tvorby tyčinkovité struktury je zobrazeno na *Obr. 9-9*. Nejdříve bylo aplikováno napětí 40 V pro tvorbu aluminové šablony. Jak bylo zmíněno v teoretické části, hliník se využívá kvůli své vysoké schopnosti samoorganizace a snadné výrobě šablony. Druhým krokem je samotné formování TiO_2 tyčinek, kterého je dosaženo zvýšením napětí na 80 V. Proces probíhal v $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ kyselině šťavelové při chlazení na 10°C .



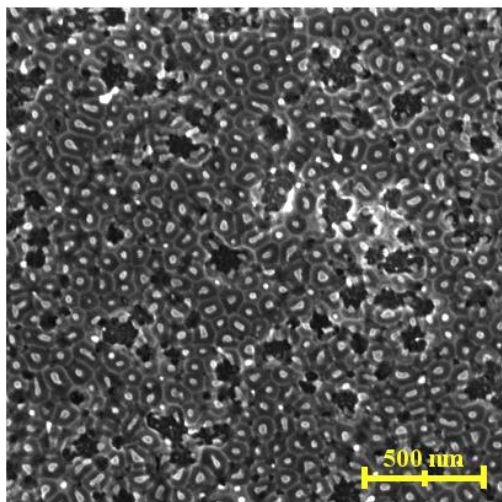
Obr. 9-9: Schéma tvorby tyčinkovité struktury pomocí aluminové šablony [42]

První zkušební vzorek byl vytvořen opravdu dvoukrokově, jelikož bylo nutné zjistit dobu trvání zformování aluminové šablony. Druhý, zkušební, byl poté vytvořen najednou, vhodným nastavením aplikovaného napětí v čase. Vzorová proudová křivka tvorby tyčinkovitých struktur je zobrazen na *Obr. 9-10*.



Obr. 9-10: Vzorový průběh anodického proudu při tvorbě nanotyčinek s využitím aluminové šablony

V případě prvních dvou zkušebních vzorků byla šablona odleptávána v leptadle, které je složeno z oxidu chromového, kyseliny fosforečné a vody, po dobu 10 minut při 55 °C. Po následné SEM charakterizaci se ovšem ukázalo, že byly tímto odstraněny i TiO₂ tyčinky. Třetí zkušební vzorek byl poté ponechán v tomtéž leptadle pouze poloviční dobu, tedy 5 minut. SEM charakterizace třetího zkušebního vzorku je uvedena níže na Obr. 9-11. Po odleptání šablony byly tyto vzorky dvakrát opláchnuty v isopropylalkoholu a osušeny vzduchem.



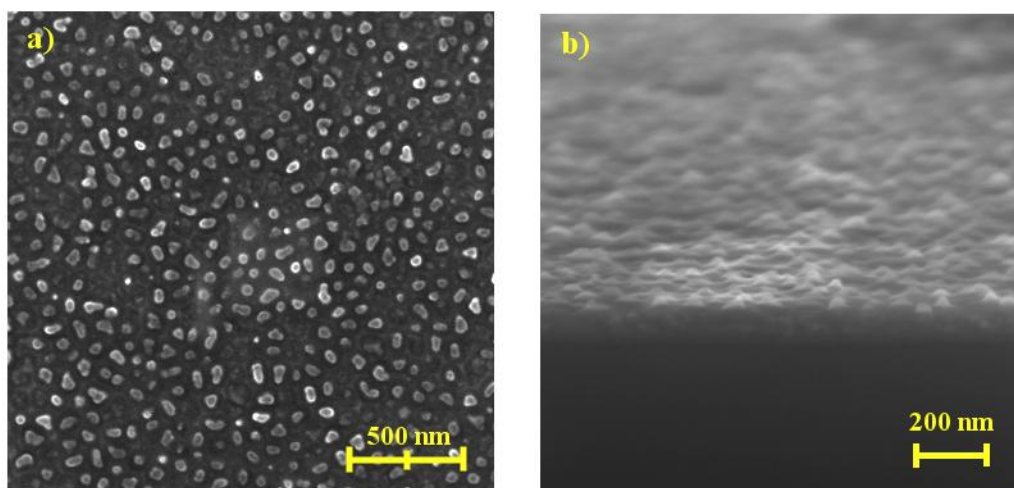
Obr. 9-11: SEM charakterizace struktury s nanotyčinkami

Z Obr. 9-11 je patrné, že na povrchu v případě leptání po dobu 5 minut dochází v jistých místech k odstranění jak šablony, tak tyčinek. Tyčinky, které na povrchu zůstaly, jsou ovšem ukotveny v tenké vrstvě aluminové šablony. To naznačuje, že takto vytvořená tyčinkovitá vrstva není schopna stát samostatně.

Vzhledem k odleptání TiO_2 vrstvy byly pro studium buněk vytvořeny vzorky, které byly leptány pouze 4 minuty při teplotě $55\text{ }^\circ\text{C}$. Průběh anodické oxidace i použitých parametrů byl zachován jako u prvních třech zkušebních vzorků. Průměrná šířka tyčinek byla 28 nm se směrodatnou odchylkou 5 nm . Hodnoty, ze kterých byl počítán průměr, jsou zobrazeny v přílohách v *Tab. 7*.

9.1.4. Nanotečky

Struktury s tečkami byly vytvářeny stejně jako tyčinky za asistence aluminové šablony v elektrolytu z $0,3\text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny šťavelové. Aplikováno bylo stabilní napětí o hodnotě 40 V po dobu 1000 s . Proces probíhal v aparatuře s řízeným průtokem, přičemž byl elektrolyt chlazen na $10\text{ }^\circ\text{C}$. Alumina byla odleptávána po dobu 5 minut při $55\text{ }^\circ\text{C}$. Formování této struktury obsahuje v podstatě dva kroky. Prvním krokem je vytvoření aluminové šablony a poté následuje prostoupení oxidové vrstvy titanu skrze aluminu a tvorbu TiO_2 teček. SEM charakterizace povrchu je uvedena níže. Po zkontrolování zkušebního vzorku bylo vytvořeno deset vzorků, za stejných podmínek, na následné studium chování buněk. Průměrná šířka tečky dosahovala hodnoty 50 nm se směrodatnou odchylkou 6 nm . Hodnoty, ze kterých byl průměr počítán, jsou zobrazeny v přílohách v *Tab. 7*. Průměrná výška tečky poté dosahovala 25 nm . SEM charakterizace vzorků je znázorněna na *Obr. 9-12*.



Obr. 9-12: SEM charakterizace struktury s nanotečkami a) pohled shora b) příčný řez

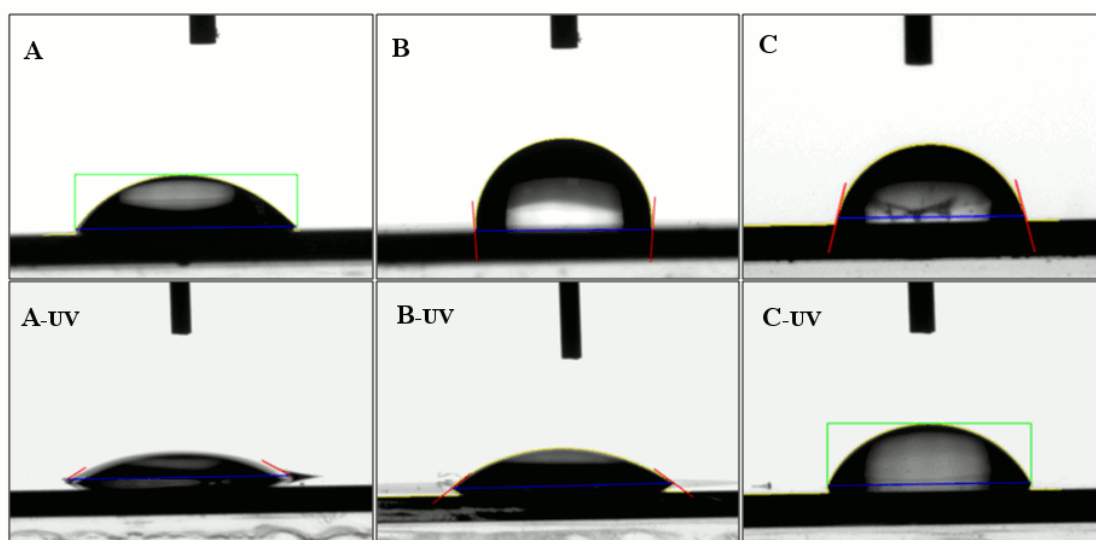
9.1.5. Měření kontaktního úhlu vrstev TiO_2

Pomocí měření kontaktního úhlu byla charakterizována smáčivost nanostrukturovaných TiO_2 povrchů připravených ke zkoumání interakce s buňkami MG-63. Kontaktní úhel byl měřen přístrojem Phoenix 300 od firmy SEO. K vyhodnocení byl poté použit program

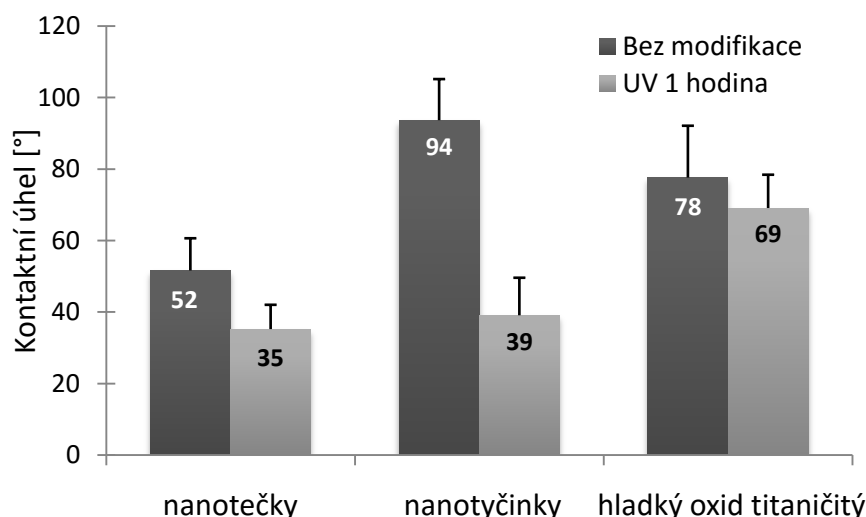
Surfaceware 8. Tekutinou tvořící kapku s pevně stanoveným objemem 500 μl byla DEMI voda.

Smáčivost byla určena pro kompaktní hladkou (bariérovou) vrstvu TiO_2 , připravenou v elektrolytu bez obsahu F^- iontů. Tento povrch byl vytvořen kvůli lepšímu hodnocení výsledků. Dále byl kontaktní úhel změřen pro nanotyčinky (Obr. 9-11) a nanotečky (Obr. 9-12). Hodnocen byl každý připravený vzorek.

Kvůli zlepšení hydrofility povrchu byly vzorky podrobeny hodinovému ozařování UV zářením ve vodě. Ponoření do vody zvyšuje účinek modifikace. Výsledné hodnoty kontaktních úhlů jsou průměrem jednotlivých hodnot. Vzhledem k tomu, že se hodnoty jednotlivých vzorků lišily, je na Obr. 9-13 uveden zástupce, který se nejvíce blížil vypočtenému průměru. Na Obr. 9-14 je znázorněna průměrná hodnota naměřeného kontaktního úhlu u jednotlivých struktur a také směrodatná odchylka.



Obr. 9-13: Kontaktní úhly vzorků bez modifikace a struktur po hodinovém ozáření UV
A) struktura s nanotečkami B) struktura s nanotyčkami C) hladký TiO_2



Obr. 9-14: Grafické porovnání hodnot kontaktního úhlu nemodifikovaných vzorků a vzorků vystavených UV záření

Z Obr. 9-14 můžeme pozorovat, že ozáření UV došlo u všech struktur ke zmenšení kontaktního úhlu. Největší pokles je patrný u struktur s nanotyčinkami, nejmenší posléze u kontrolních vzorků kompaktní vrstvy TiO_2 . Ačkoliv došlo ke zlepšení smáčivosti povrchů, prvotním očekáváním bylo dosažení superhydrofilního stavu [36], kdy se povrch stává smáčivý až do takové míry, že kapalina na povrchu nevytvoří kapku, ale zcela se rozlije. Tohoto stavu se nám bohužel dosáhnout nepodařilo v rámci testované jedné hodiny. Dosažení smáčivějšího povrchu by vyžadovalo delší optimalizaci v čase a také zjištění stability udržení smáčivějšího povrchu v delším časovém horizontu. V případě hladkého nemodifikovaného kontrolního povrchu byl naměřen průměrný úhel o hodnotě 78° což je o 20° více než je publikováno například v literatuře [58]. Tento rozdíl může být způsoben rozdílnou vrstvou oxidu na povrchu nebo také metodou výroby.

Kontaktní úhly vzorků stejné struktury se značně lišily, což dokazuje, že jednotlivé vzorky nebyly dostatečně kvalitně reprodukovány, ačkoliv byly vždy vytvářeny za stejných podmínek. To, že se vzorky navzájem lišily, se projevilo také ve velkých odchylkách měření při každém dílčím testu chování buněk na nanostrukturovaných površích.

Další vliv by mohla mít časová stabilita modifikace povrchu. Je totiž možné, že zvýšení smáčivosti povrchu dosažené pomocí UV záření nemusí být stabilní v čase, tak jak se uvádí v literatuře [36]. Po čase by se povrchy mohly vracet do původního stavu, což by mohlo mít neblahý vliv na adhezi buněk. Časovou stabilitu modifikace povrchů se nám bohužel s časových důvodů nepodařilo naměřit.

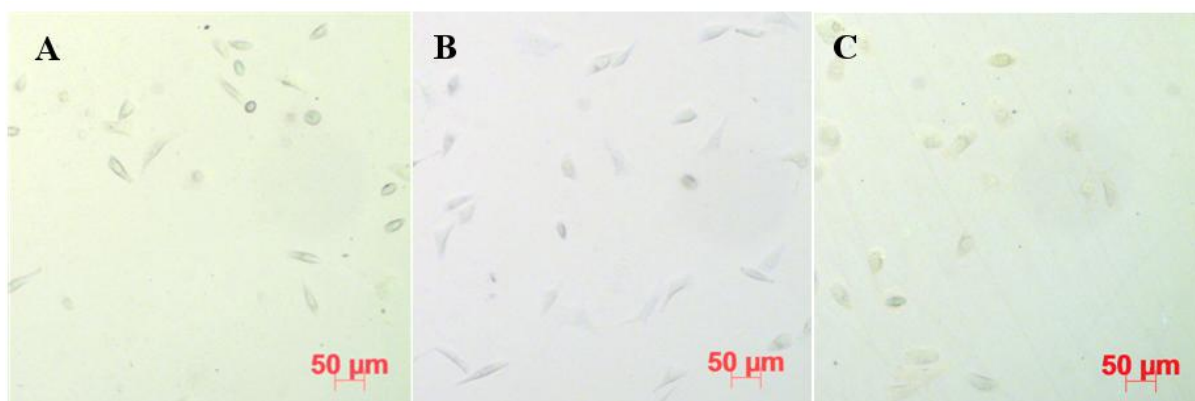
9.2. Interakce buněk s nanostrukturovanými povrchy

Interakce buněk s nanostrukturovanými povrchy byla zkoumána pouze u povrchů vytvořených za asistence aluminové šablony (nanotyčinky a nanotečky) a na kontrolním vzorku s kompaktní bariérovou vrstvou TiO_2 . Porézní a tubulární struktury taktéž vyrobené

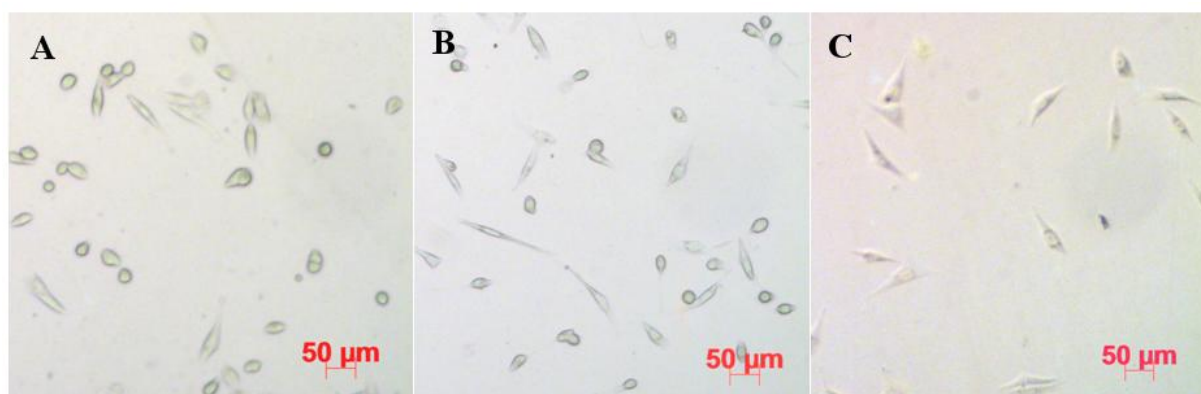
k tomuto účelu, které byly zmíněny v předchozí části práce, bohužel s postupem času zkorodovaly. Toto bylo zapříčiněno nejspíše použitím poměrně vysokého napětím při výrobě nanostrukturovaných povrchů na tenkou vrstvu titanu. Dalším aspektem mohlo být také nekvalitní naprášení původní vrstvy titanu, které činilo problémy již při vyvážení složek elektrolytu pro výrobu kvalitních tubulárních struktur.

9.2.1. Adheze buněk na nanostrukturované povrchy

Adheze buněk na nanopovrchy byla pozorována po pěti hodinách a posléze po 24 hodinách od nasazení buněk na testované povrchy. Počet a základní morfologie byla zkoumána optickým mikroskopem ve viditelné oblasti. Následně byly spočítány jednotlivé buňky a po 24 hodinách byl vyhodnocen poměr rozvětvených navázaných buněk a buněk kulaté morfologie. Zobrazení buněk mikroskopem po pěti hodinách je zobrazeno na Obr. 9-15. Po 24 hodinách jsou poté buňky na nanostrukturovaném povrchu zobrazeny na Obr. 9-16.



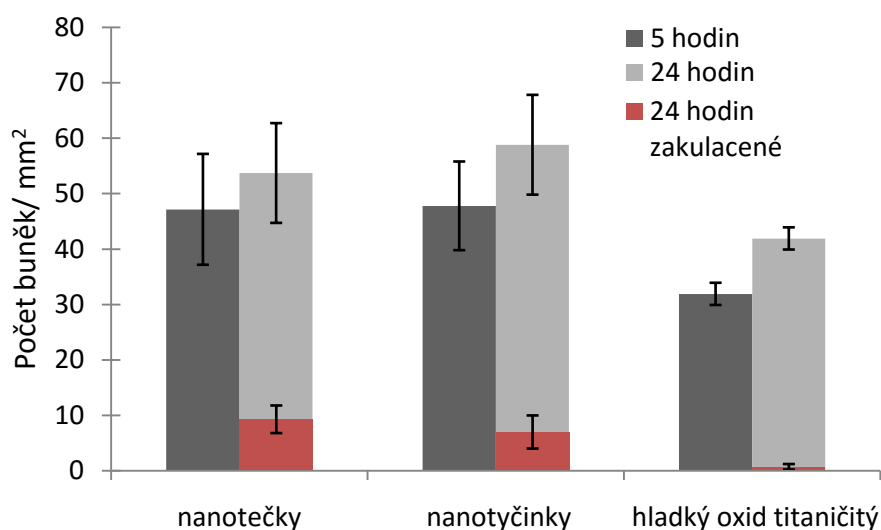
Obr. 9-15: Buňky na nanostrukturovaných površích po 5hodinové inkubaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký TiO_2



Obr. 9-16: Buňky na nanostrukturovaných površích po 24hodinové inkubaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký TiO_2

Na *Obr. 9-15* a *Obr. 9-16* jsou patrné různé morfologie buněk. V případě struktur s nanotečkami a nanotyčinkami se zde nachází ve větší míře podlouhlé buňky a buňky kruhové. To, že je buňka kruhového tvaru může naznačovat, že je adheze k povrchu slabá. Taktéž podlouhlý tvar může naznačovat určitý buněčný stres či migraci. U hladkého povrchu buňky zaujímají více rozvětvený tvar, což by mohlo naznačovat lepší adhezní podmínky pro buňky. Pouze morfologie ovšem nepotvrzuje, zdali je buňka i metabolicky aktivní. Metabolismus buněk byl proto hodnocen pomocí MTT testu proliferace a stanovením aktivity alkalické fosfatázy. Optická mikroskopie ovšem není ideální zobrazovací modalitou pro zobrazení buněk. Morfologii buněk jsme proto podrobněji zkoumali v následujících bodech, kde byly buňky zobrazeny pomocí SEM a také pomocí fluorescenčního značení aktinu.

Grafické znázornění celkového průměrného počtu buněk na struktuře přepočteného na plochu 1 mm^2 a jejich směrodatná odchylka je zobrazeno na *Obr. 9-17*. Při pozorování po 24 hodinách je červeně vyznačen počet buněk kruhové morfologie. Počet hodnot, ze kterých jsou hodnoty stanoveny, se lišil podle počtu nasnímaných obrazů. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v příloze v *Tab. 8* až *Tab. 10*.



Obr. 9-17: Grafické vyjádření počtu buněk na nanostrukturovaných površích po 5 a 24 hodinách, červeně vyznačen počet slabě adherovaných buněk

Nejvíce zakulacených buněk vykazuje povrch s nanotečkami. Ačkoliv byl tento povrch nejvíce smáčivý, neposkytuje pro buňky vhodnější alternativu než je hladký oxid titaničitý. Na povrch s nanotyčinkami se sice navázalo více buněk než na kontrolní hladký povrch, ovšem i tento povrch vykazuje po jednom značný počet buněk s kulatou morfologií.

Tento test tedy příliš neprokázal zlepšení adheze buněk na nanostrukturovaných površích. Přesnější stanovení a potvrzení počtu adherovaných buněk, jako i počet morfologicky odlišných buněk, by vyžadovalo více nezávislých vzorků a detailnější studium, což by souviselo s časovou náročností tohoto experimentu. Tento výsledek také vyvrací

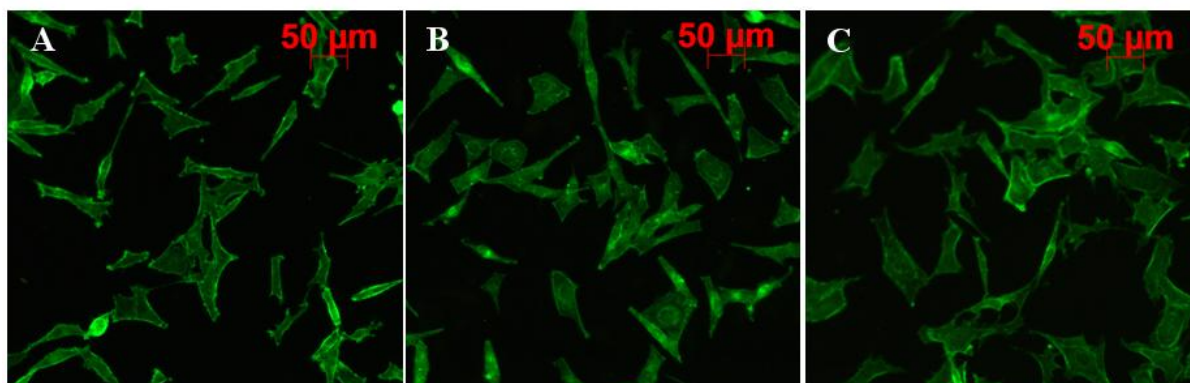
přímou souvislost smáčivosti na adhezi buněk. Nicméně pokud vezmeme v potaz nestabilitu UV ošetřeného povrchu, povrchová změna mohla být příčinou určitého stresu v buňkách, což vedlo k jejich změně tvaru na zakulacený.

9.2.2. Stanovení morfologie buněk

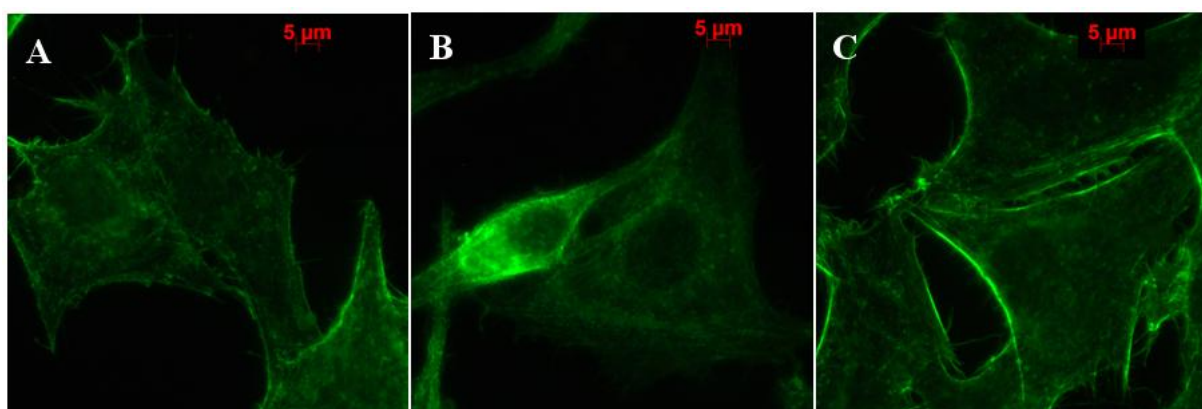
Pro lepší zobrazení morfologie buněk na nanostrukturovaných površích byly buňky po 24 hodinové kultivaci zafixovány a zobrazeny pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu a barvením aktinových vláken buněčného cytoskeletu.

Fluorescenční značení aktinu

Aktin byl zobrazen pomocí faloidinového barviva ActinGreen s excitační vlnovou délkou 488 nm. Snímky fluorescenčně značených buněk jsou zobrazeny na *Obr. 9-18* a na *Obr. 9-19* kde je lépe patrná organizace aktinových vláken.



Obr. 9-18: Buňky s fluorescenčně značeným aktinem po 24hodinové kultivaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký oxid titaničitý

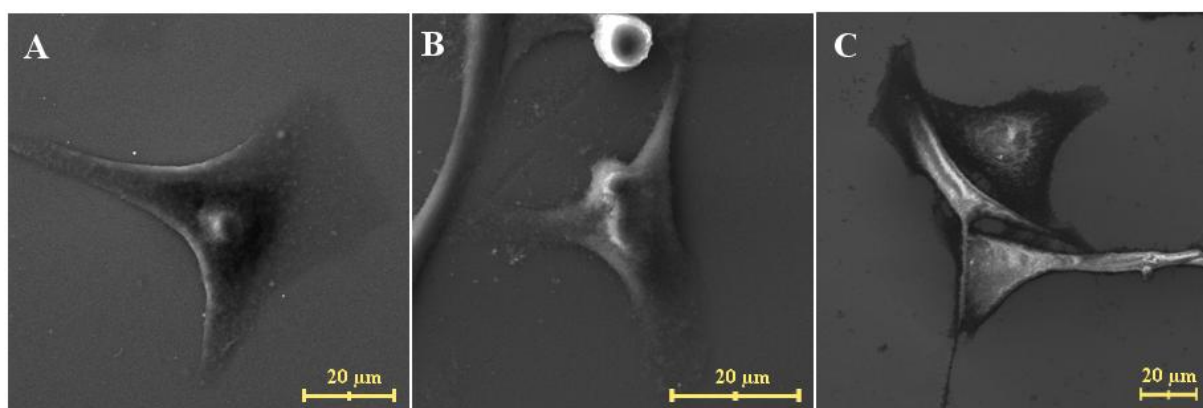


Obr. 9-19: Detail buněk s fluorescenčně značeným aktinem po 24hodinové inkubaci A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký oxid titaničitý

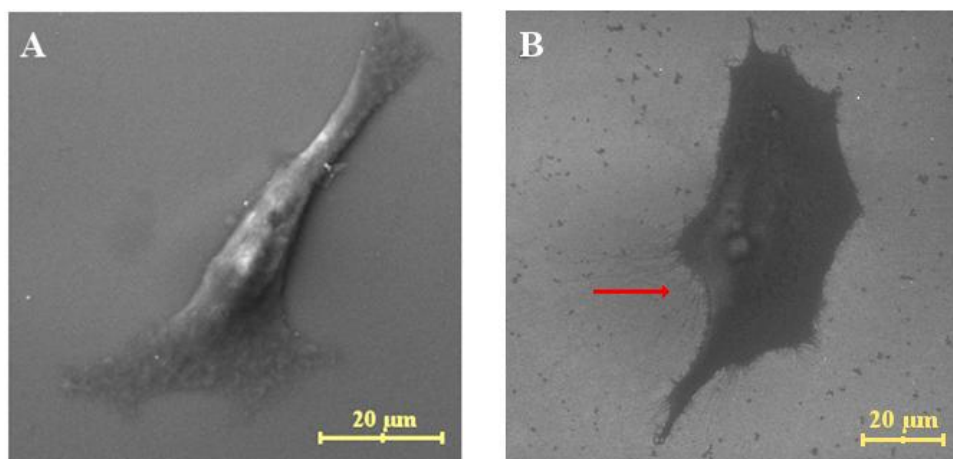
Z Obr. 9-18 je patrné, že v případě nanoteček a nanotyčinek nejsou buňky tolik rozvětvené jako na hladkém povrchu. V obou případech nanostrukturovaného povrchu se buňky nachází spíše v podlouhlé morfologii, zatímco u hladkého povrchu převažují buňky rozvětvené morfologie. Z toho lze usuzovat, že hladký povrch oxidu titaničitého poskytuje lepší prostředí pro adhezi buňky než nanotečky a nanotyčinky. Z detailnějšího snímku na Obr. 9-19 je patrné, že aktinová vlákna nejsou organizovaná a není nijak viditelná změna v produkci aktinu. Evidentní je charakteristická vrstva aktinových vláken pod buněčnou membránou. Buňky na všech třech površích vykazují výběžky (filopodia a lamelipodia), což značí dobrou adhezi. Detailnější zkoumání by vyžadovalo optimalizaci v technice fixování a barvení aktinových vláken a mikroskop s lepším rozlišením, abychom mohli lépe zobrazit a vyhodnotit organizaci aktinových vláken. V dalším studiu by bylo vhodné obarvit protein fokálních kontaktů jako je vinculin. Zde bychom mohli lépe vidět a zhodnotit, jak silná je adheze buněk k příslušnému povrchu. V dostupné literatuře [58] bylo publikováno, že hladký povrch oproti povrchům zdrsněným byl po jednom dni kultivace příznivější pro buňky. Buňky na něm zabíraly mnohem větší plochu, což značí větší rozprostření a lepší adhezi. To bylo potvrzeno i v našem případě porovnání hladkého povrchu oxidu titaničitého se strukturou nanoteček a nanotyčinek.

SEM charakterizace buněk

Dehydratované buňky zobrazené touto technikou jsou zobrazeny na Obr. 9-20. Tyto buňky byly fixovány jako v případě fluorescenčního značení po 24 hodinové kultivaci. Buňky byly zobrazeny pomocí zdroje sekundárních elektronů. Navíc jsou buňky mikroskopovány bez pokovení, což má za následek zhoršenou kvalitu snímků a detailnější zobrazení buněčných struktur. Nicméně i přesto je zobrazení pro tuto práci dostatečné.



Obr. 9-20: SEM charakterizace buněk rozvětvené morfologie na TiO_2 površích A) nanotečky B) nanotyčinky C) hladký TiO_2



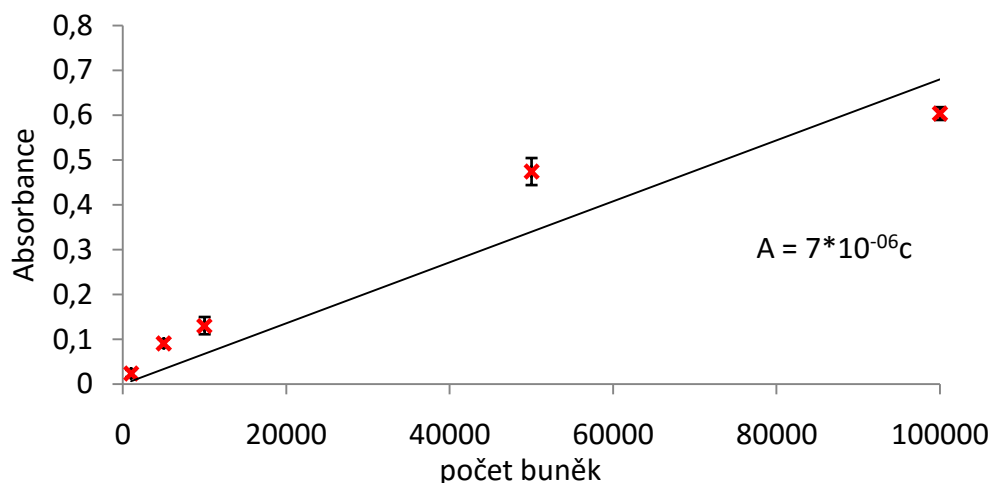
Obr. 9-21: SEM charakterizace A) buňka s podlouhlou morfologií a charakteristickými výběžky lameliopodií B) filopodium (šipka)

Na Obr. 9-20 můžeme vidět rozvětvené buňky na všech zkoumaných površích. U nanoteček, nanotyčinek i u hladkého povrchu jsou zřetelné struktury zvané lamelipodia, které jsou mimo jiné i znakem dobré adheze. Na Obr. 9-21 B) jsou poté viditelná filopodia. Opět se potvrzuje jako u fluorescenčního značení aktinu, že buňky na hladkém povrchu dosahují většího a mnohonásobnějšího rozvětvení. Jednotlivé buňky také zabírají větší plochu. U nanostrukturovaných povrchů se také ve větší míře nachází buňky podlouhlého tvaru, které mají morfologii která je zobrazena na Obr. 9-21 A). I v tomto případě tedy nebylo potvrzeno, že by nanostrukturované povrchy poskytovaly pro buňku lepší prostředí.

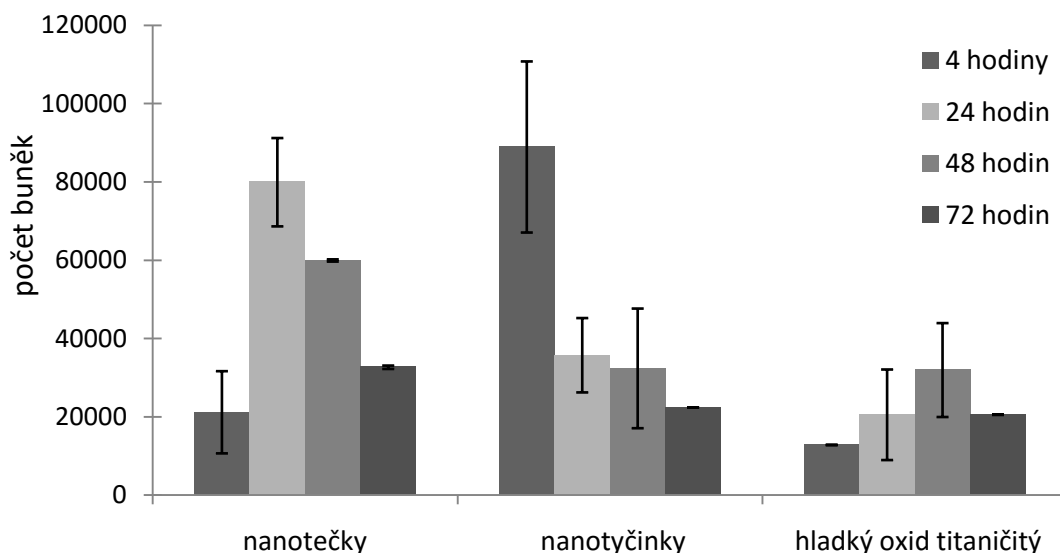
Oproti nanotubulárním strukturám, které zlepšují adhezi [19] tedy struktury s nanotyčinkami a nanotečkami nevykazují tendenci ke zlepšení adheze. S rostoucí výškou tyčinek by mělo klesat rozprostírání buněk [59], to by ovšem naznačovalo lepších výsledků v případě nanoteček oproti tyčinkám. Tento trend se nám tedy potvrdit nepodařilo.

9.2.3. Proliferace buněk na nanostrukturovaných površích

Proliferace buněk byla hodnocena pomocí MTT testu po 4, 24, 48 a 72 hodinách. Pro převod hodnot absorbance na počet buněk byla vytvořena kalibrační křivka. Tato křivka je znázorněna na Obr. 9-22. V každém časovém intervalu, byl hodnocen jeden nebo dva vzorky příslušné struktury. MTT bylo s buňkami inkubováno vždy 4 hodiny při 37 °C. Absorbance byla měřena při 570 nm a poté převedena na počet podle kalibrační křivky. Výsledné průměrné počty buněk po příslušném časovém intervalu jsou znázorněny na Obr. 9-23. Hodnoty jsou vypočítány z jednoho nebo dvou vzorků příslušné nanostruktury. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v přílohách v Tab. 14.



Obr. 9-22: Kalibrační křivka pro převod absorbance vzniklého formazanu na počet buněk u MTT testu



Obr. 9-23: Grafické znázornění výsledků MTT testu v počtu buněk po 4, 24, 48 a 72 hodinách kultivace na nanostrukturách

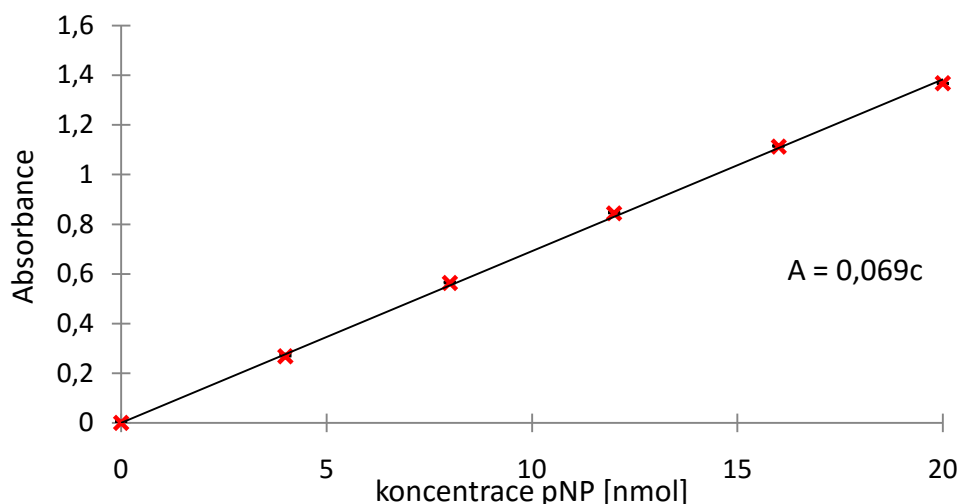
Z MTT testu proliferace vyplývá, že nanostrukturované povrchy s nanotečkami a nanotyčinkami nepodporují proliferaci buněk. V případě nanoteček byl po prvním dnu patrný velký nárůst počtu buněk. Po tomto prvotním náběhu ovšem nastal pokles, který se potvrdil i po 72 hodinách inkubace. S časem tedy došlo ke snížení počtu živých buněk na povrchu s nanotečkami. V případě tyčinek nastal značný pokles již po jednom dni inkubace. Ačkoliv se na tomto povrchu nacházelo po 4 hodinách nejvíce buněk, s časem počty pouze klesaly. To naznačuje odumírání buněk na povrchu, což je nežádoucí jev.

Nejlépe dopadl opět hladký povrch oxidu titaničitého, který jako jediný prokázal mírně stoupající tendenci, nicméně po čtyřech dnech počet buněk začal klesat.

Pokles proliferace buněk v čase může mít vztah z výše uváděnou nestabilitou modifikace smáčivosti povrchů pomocí UV záření. Oproti tubulárním strukturám publikovaným v literatuře [60], kde ve všech případech struktur s rozličným průměrem trubek proliferace s časem rostla. V našem případě nanostrukturovaných povrchů v podobě nanoteček a nanotyčinek pouze klesala. Tento test tedy neprokázal zlepšení proliferace buněk na zkoumaných površích. Každopádně výsledky nemusí být jednoznačné, protože jsou zde velké odchylky dané malým počtem testovaných vzorků (např. pouze jeden u hladkého povrchu a maximálně dva pro ostatní struktury). To vnáší do výsledků značnou chybu, tudíž i tento experiment by bylo nutné zopakovat pro získání věrohodnějších dat.

9.2.4. Stanovení aktivity alkalické fosfatázy

Markerem diferenciaci a proliferace buněčné linie MG-63 je alkalická fosfatáza. Tento enzym je možné stanovit pomocí enzymatické reakce, kdy je výsledný produkt možné kolorimetricky měřit při vlnové délce 405 nm. K hodnocení aktivity ALP je nutné sestavit kalibrační křivku, která nám udává závislost absorbance na koncentraci vzniklého produktu. Tato křivka je znázorněna na *Obr. 9-24*. Při měření je nutné striktní dodržení času, po který enzym se substrátem v podobě p-nitrofenyl fosfátu (pNPP) reaguje. Proto je po této době do roztoku přidáván tzv. stop roztok, který reakci zastaví, aby bylo možné jednotlivé vzorky porovnávat. Aktivita alkalické fosfatázy byla měřena po 48 a 72 hodinách kultivace buněk na površích. Absorbance výsledného žlutě zbarveného produktu byla měřena při 405 nm po 4 hodinách inkubace se substrátem. Tato doba odečtu byla navýšena, oproti 1 hodině u kalibrační křivky, z důvodu nízké produkce ALP nebo malé aktivity enzymu. To znamená, že hodnoty vzniklého produktu byly pod mezí detekce. Prodloužením času inkubace jsme prodloužili čas potřebný pro přeměnu substrátu a vzniku produktu do měřitelných hodnot.



Obr. 9-24: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace přeměněného *p*-nitrofenolu

Pomocí této kalibrační křivky lze zjistit koncentraci produktu reakce pNPP (substrát) s enzymem ALP. Jednotlivé koncentrace je poté nutné přepočítat na aktivitu alkalické fosfatázy podle rovnice (14), kde se bere v úvahu právě čas reakce a objem vzorku. Níže je uveden příklad pro přepočet absorbance pNP na aktivitu ALP v U/ml. Konkrétní hodnoty náleží buňkám na nanotečkovité struktuře po 48 hodinové kultivaci.

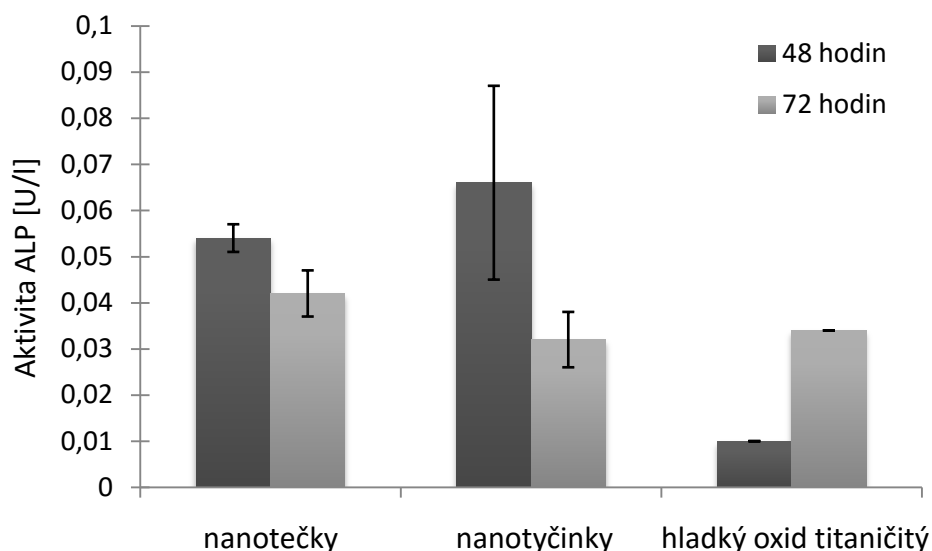
Koncentrace pNP: $A = 0,00105 \mu\text{mol}$

Doba reakce: $T = 240 \text{ min}$

Objem vzorku: $V = 0,08 \text{ ml}$

$$ALP \text{ aktivita} = \frac{A/T}{V} = \frac{1,05 \cdot 10^{-3}/240}{0,08} = 54,69 \cdot 10^{-6} = \mathbf{0,054 \text{ U/l}}$$

Výsledný průměr a směrodatné odchylky vypočítaných aktivit jsou zobrazeny pomocí sloupcového grafu na Obr. 9-25. Hodnoty všech naměřených a přepočítaných dat jsou uvedeny v přílohách v Tab. 16 a Tab. 17.



Obr. 9-25: Grafické vyjádření aktivity alkalické fosfatázy na nanostrukturovaných površích

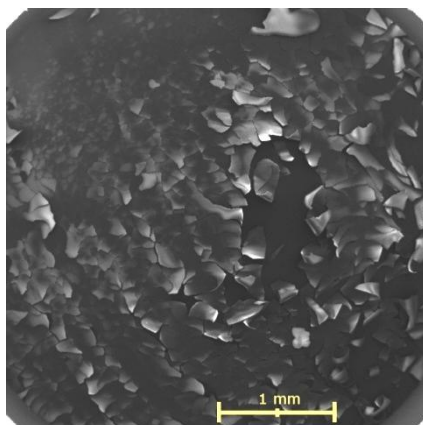
Stanovení aktivity alkalické fosfatázy, díky které je možné hodnotit diferenciaci a proliferaci buněk opět prokázal klesající trend u zkoumaných nanostrukturovaných povrchů. Ačkoliv po 48 hodinách inkubace byla aktivita největší u nanotyčinek, po 72 hodinách nastal pokles hodnot. Tento trend koresponduje s MTT testem proliferace. I v případě nanoteček došlo k poklesu, avšak ne tak rapidnímu. Jako v případě zkoumání morfologie buněk a testování proliferace, vykazoval stoupající závislost pouze hladký povrch oxidu titaničitého. Nicméně zaznamenaný nárůst ALP v 72 hodině nekoresponduje s poklesem počtu buněk u MTT testu. Zde by mohlo jen dojít ke zvýšení produkce ALP přeživších buněk na hladkém povrchu. Opět je zde diskutovatelný počet a kvalita testovaných vzorků, aby mohly být hodnoty lépe interpretovatelné, jasně a statisticky obhajitelné.

9.3. Shrnutí výsledků a rozbor vzniklých komplikací

Největší komplikací v rámci vypracování této diplomové práce byla degradace vytvořených nanoporézních povrchů, které měly být následně podrobeny studiu chování buněk na tomto povrchu. Z časového hlediska poté nebylo možné struktury vyrobit znovu. Z toho důvodu jsou v práci hodnoceny pouze struktury vytvářené pomocí dvoukrokové anodické oxidace za přispění šablony z oxidu hlinitého.

Pro studium chování buněk byly vytvořeny struktury s velkými póry, které jsou zobrazeny na Obr. 9-4 a). Nestabilita těchto velkých porézních struktur mohla být způsobena především vysokým napětím při výrobě. Společně s tím mohl být problém v tom, že struktury byly vytvářeny na tenkých vrstvách, což v kombinaci právě s vyvíjeným napětím vrstva nevydržela. Struktury se tedy staly nestabilní. Po několika týdnech došlo k rozrušení nanostrukturovaného povrchu a k odloupení svrchní části. Například při výrobě porézní

struktury při 100 V na původní vrstvě titanu a tloušťce 900 nm došlo k popraskání povrchu již při výrobě. Toto poškození je zobrazeno na *Obr. 9-26* níže.



Obr. 9-26: Znehodnocený povrch porézní struktury vytvářené při 100 V na původní vrstvě 3×300 nm.

Dalším problémem těchto vzorků mohl nastat již ve způsobu naprašování. Původní vrstva titanu byla totiž naprašována ve třech krocích postupně po 300 nm. To mohlo způsobit nekompaktnost vrstvy a tím i pozdější nestabilitu. Z *Obr. 9-3* jsou také patrné zrnovité artefakty, které se na této původní vrstvě nacházejí. Tato „zrna“ poté způsobují nerovnoměrné působení iontů, což mohlo též přispět k nestabilitě struktur.

Týkající se malých porézních struktur (*Obr. 9-5 b*) s otvory okolo 25 nm, struktury degradovaly pravděpodobně z důvodu velmi tenké původní vrstvy titanu. U těchto vzorků totiž dosahovala pouhých 200 nm. Tyto struktury na vzduchu vydržely. Problém nastal po ponoření do kultivačního média, kde došlo opět k odloupání horní vrstvy. Problém mohl také nastat opět ve způsobu naprašování na křemíkový substrát.

V případě tubulárních struktur byl problém již v samotném vyvážení složek elektrolytu tak, aby bylo dosaženo kvalitní tubulární struktury. Po dosažení vhodného poměru složek elektrolytu, kdy bylo dosaženo rovnováhy oxidace a leptání na jedné sadě naprášeného titanu se nepodařilo reprodukovat výsledky na jiné sadě, ačkoliv obě sady měly mít naprášenou vrstvu titanu o tloušťce 500 nm. Nebylo tedy možné tubulární struktury vytvořit, jelikož by bylo nutné vyvažovat elektrolyt speciálně pro jednu danou sadu naprášené vrstvy.

Kvůli výše zmíněným komplikacím byly pro studium chování buněk použity pouze nanotečky a nanotyčinky. Tyto dvě struktury byly pro hodnocení srovnávány s hladkým povrchem oxidu titaničitého.

Prvním krokem pro hodnocení buněčné interakce byla charakterizace smáčivosti těchto povrchů pomocí měření kontaktního úhlu. Pomocí UV záření byly povrchy modifikovány tak, aby se staly více hydrofilními. Předpokládaného stavu superhydrofility dosaženo nebylo, avšak k poklesu kontaktního úhlu došlo u všech struktur. Měření kontaktního úhlu bohužel

ukázalo, že se jednotlivé struktury nepodařilo zcela bezchybně reprodukovat. Tento fakt poté činil problémy v hodnocení jednotlivých testů na buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci. To se odrazilo také v odchylkách změřených hodnot.

Buněčná adheze byla zkoumána po 5 a 24 hodinách inkubace pomocí optického mikroskopu. Počet buněk byl největší na struktuře s nanotyčinkami. Počet slabě adherovaných buněk byl oproti kontrolnímu hladkému povrchu značně větší na nanostrukturovaných površích. Tento výsledek tedy neprokazuje zvýšenou podporu adheze. Proto byla zkoumána i morfologie buněk pomocí fluorescenšního značení a také zobrazení buněk pomocí SEM. Zobrazení buněk těmito způsoby opět naznačilo, že hladký oxid titaničitý je oproti zkoumaným nanostrukturám pro buňky příznivější.

MTT test proliferace i test aktivity alkalické fosfatázy ukázaly klesající trendy v počtu živých navázaných buněk na zkoumané nanostrukturované povrchy. To znamená postupné odumírání buněk na površích, ačkoliv prvotní hodnoty převyšovaly kontrolní hladký povrch více než dvojnásobně. Stoupající tendenci, tedy množení a postupné navyšování počtu buněk prokázal pouze hladký oxid titaničitý. U ALP aktivity tedy můžeme říci, že nanostrukturované povrchy mohly vést k vyšší produkci ALP oproti hladkému po 24 hodinách. Po 72 hodinách aktivitu mohl poznamenat fakt odumírání buněk. Každopádně u hladkého povrchu se víceméně pracovalo pouze s jedním vzorkem, což určitě má velký podíl na správnosti či přesnosti získaných dat.

V časovém sledu experimentů bylo jako poslední prováděno hodnocení morfologie buněk pomocí SEM. Z detailního snímku bylo patrné, že během manipulace se vzorky došlo během experimentů k odstranění tyčinek oxidu titaničitého. Po této struktuře zůstaly pouze velice mělké prohlubně. Z tohoto důvodu nelze přesně interpretovat výsledky, jelikož nevíme, ve kterém časovém okamžiku došlo k odmytí tyčinek. Nanotečky ovšem zůstaly stabilní.

Závěr

Diplomová práce se zabývala výrobou nanostrukturovaných povrchů TiO_2 na tenké vrstvě titanu a následným studiem chování buněk na těchto strukturách. V teoretické části je zpracována teoretická rešerše výroby nanostruktur metodou anodické oxidace. U této metody je popsán detailnější postup výroby a vliv vnějších faktorů na geometrické parametry nanostrukturovaných povrchů. Je zde zmíněna také charakterizace nanostrukturovaných povrchů, kterými je zobrazení pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu a určení smáčivosti pomocí měření kontaktního úhlu. Dále práce obsahuje přehled využití TiO_2 nanostruktur v oblasti biomedicíny a popis interakce buněk s povrchem a také možnosti modifikace povrchu pro zlepšení této interakce. Teoretická část je uzavřena popisem metod pro zkoumání chování buněk, které zahrnuje testy adheze, zobrazení a zkoumání morfologie buněk, testy proliferace a diferenciací.

V praktické části bylo vytvořeno několik nanoporézniých a nanotubulárních struktur pomocí přímé potenciostatické anodické oxidace. U těchto struktur je dobře patrný vliv napětí, kdy s rostoucím napětím klesá doba anodizace a do určité hodnoty napětí roste průměr pórů. Pro následné zkoumání chování buněk byly vytvořeny dva typy nanoporéznií struktury. Připravené struktury se ovšem nejspíše vlivem vysokého napětí na tenkou vrstvu titanu staly nestabilní a proto k testování buněk nebyly využity. Dále byly vytvořeny nanotubulární struktury, kde byl zkoumán vliv fluoridových iontů a vliv koncentrace vody v elektrolytu. Bylo prokázáno, že i malá změna koncentrace má velký vliv na výslednou strukturu.

Jako další byly vytvořeny tyčinkovité struktury s využitím šablony z Al_2O_3 . U těchto struktur je sěžejní proces odstranění aluminové šablony tak, aby nebyla poškozena titanová oxidová vrstva. Při úplném odleptání šablony nebyly tyčinky schopny samostatně stát. Proto byly vytvořeny struktury s nedokonale odstraněnou šablonou, která slouží k ukotvení tyčinkovité struktury. Stejnou metodou byly vytvořeny také nanotečky.

Studiu chování buněk byly tedy podrobeny pouze struktury v podobě nanoteček a nanotyčinek vytvářené pomocí aluminové šablony. Jako kontrolní povrch, pro lepší hodnocení, bylo využito hladké vrstvy oxidu titaničitého, vytvořeného anodickou oxidací bez přídavku fluoridových iontů.

Hodnoty kontaktního úhlu pro hodnocení smáčivosti povrchu byly nejlepší u struktury s nanotečkami, kde kontaktní úhel dosahovat hodnoty 52° . Proto byla provedena modifikace povrchů UV zářením. Po ozáření poklesla hodnota kontaktního úhlu u všech třech hodnocených povrchů. Nejvíce se zhydrofilizoval povrch s nanotyčinkami, kde došlo k poklesu hodnot z 94° na 39° .

Test adheze buněk na nanostrukturovaných površích po 5 a 24 hodinách inkubace vykazoval zvýšení počtu buněk ovšem s velkým poměrem slabě adherovaných buněk oproti kontrolnímu hladkému povrchu. Menší podporu adheze oproti hladkému TiO_2 prokázala i vizualizace buněk fluorescenčním značením aktinu a zobrazení pomocí rastrovacího

elektronového mikroskopu. Buňky na hladkém povrchu byly mnohem více rozprostřeny a zabíraly větší plochu povrchu.

Dále byl proveden MTT test proliferace. Proliferace byla měřena po 4, 24, 48 a 72 hodinách inkubace. V případě nanoteček došlo po 24 hodinové inkubaci k velkému náběhu a následně k poklesu počtu živých buněk. U nanotyčinek byl zaznamenán pouze pokles. Tyto výsledky prokazují, že tyto povrchy nezlepšují buněčnou proliferaci. To potvrdil i test diferenciací pomocí měření aktivity alkalické fosfatázy. Opět došlo u obou nanostrukturovaných povrchů k poklesu hodnot v čase. Měřením ALP aktivity po 48 hodinách bylo prokázáno, že vyšší aktivita je u nanopovrchů než u hladkého povrchu. Po 72 hodinách zde byl již vliv postupného odumírání buněk. Naopak u hladkého povrchu s menším počtem buněk aktivita ALP mírně narůstala.

Při posledním měření, kterým bylo hodnocení morfologie buněk pomocí SEM, bylo zjištěno, že v průběhu experimentů došlo k odstranění nanotyčinkovité struktury. Z tohoto důvodu nemůžeme považovat dosažené výsledky u této struktury za průkazné. Nanotečkovitá struktura však neprokázala zlepšení adheze a proliferace buněk. Tato práce ukázala určitý možný trend interakce buněk s nanostrukturovanými povrchy. Nicméně hodně práce v budoucnu musí být uděláno ve zlepšení přípravy nanostruktur a navýšení počtu vzorků pro statistické vyhodnocení, abychom mohli správně interpretovat dosažené výsledky.

IV. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MAJEED, A. et al. Surface properties and biocompatibility of nanostructured TiO₂ film deposited by RF magnetron sputtering. *Nanoscale Research Letters*, 2015, sv. 10, s. 1-9. ISSN 1556-276X.
- [2] VANDROVCOVA et al. Adhesion, Growth and Differentiation of Osteoblasts on Surface-Modified Materials Developed for Bone Implants. *Physiological Research*, 2011, sv. 60, č. 3, s. 403-417. ISSN 0862-8408.
- [3] COUFALOVÁ, J. Totální endoprotéza kyčelního kloubu. [online]. UNIFY ČR, [cit. 22. 12. 2015]. Dostupné z: <http://www.unify-cr.cz/download/fblr/pks_20_006_fblr_6.pdf>.
- [4] ROMAN, K. Vzdělávání v nanotechnologiích. [online]. [cit. Dostupné z: <<http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/VzdelavaniNano.pdf>>.
- [5] GERLA, V. Nanotechnologie v Medicíně. [online]. [cit. 21.10. 2015]. Dostupné z: <<http://nanomedicina.sweb.cz/>>.
- [6] XIA, Y. N. et al. One-dimensional nanostructures: Synthesis, characterization, and applications. *Advanced Materials*, 2003, sv. 15, č. 5, s. 353-389. ISSN 0935-9648.
- [7] ALEXANDER, G. Nanostructured material. [online]. Glossary of nanotechnology and related terms, [cit. 4.11. 2015]. Dostupné z: <<http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1371>>.
- [8] ROY, P. et al. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angew. Chem. Int.*, 2011, sv. 50, č. doi: 10.1002/anie.201001374, s. 2904–2939.
- [9] LORYUENYONG, V. et al. Sol-gel derived mesoporous titania nanoparticles: Effects of calcination temperature and alcoholic solvent on the photocatalytic behavior. *Ceramics International*, 2012, sv. 38, č. 3, s. 2233-2237. ISSN 0272-8842.
- [10] J.R.SMYTH. TiO₂ Group. [online]. University of Colorado, [cit. Dostupné z: <<http://ruby.colorado.edu/~smyth/min/tio2>>.
- [11] ŠTENGL, V. Kouzelný oxid titaničitý. *Vesmír*, 2008, sv. 87, s. 402-403.
- [12] MRÁZ, J. Je nano-oxid titaničitý škodlivější než „běžný“ oxid titaničitý? [online]. SZÚ Praha, [cit. 21.10. 2015]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/uploads/6_Mraz.pdf>.
- [13] ZHANG, Z. Osteoblastic cell adhesion on Strontium-incorporated porous nanostructured TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation. *Journal of Clinical & Experimental Orthopaedics*, 2015, sv. 1, č. 1, s. 1-6.
- [14] NOVAES, A. B. et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal*, 2010, sv. 21, č. 6, s. 471-481. ISSN 1806-4760.
- [15] MORAVEC, H. et al. Modification of Titanium Surface for Medical Applications. *Chemicke Listy*, 2014, sv. 108, č. 1, s. 40-45. ISSN 0009-2770.
- [16] BACAKOVA, L. et al. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research*, 2004, sv. 53, s. S35-S45. ISSN 0862-8408.
- [17] BAČÁKOVÁ, L. Interakce buněk s materiály pro tkáňové inženýrství. [online]. Akademie věd České republiky, [cit. 2.3. 2016]. Dostupné z: <http://www.beckman.cz/Media/Default/Dokumenty/DNAXI-presentations/1230-Bacakova_tkanove_inzenyrstvi_Beckman%20s.pdf>.
- [18] KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*, 2015, sv. 26, č. 6. ISSN 0957-4484.
- [19] MINAGAR, S. et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, sv. 101, č. 9, s. 2726-2739. ISSN 1549-3296.

- [20] LAVENUS, S. et al. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. *European Cells & Materials*, 2011, sv. 22, s. 84-96. ISSN 1473-2262.
- [21] Fluo Cell Double Staining Kit (Calcein / PI). [online]. Mo Bi Tec, [cit. 6.3. 2016]. Dostupné z: http://www.mobitec.com/cms/products/bio/07_fluores_tec/mfp_cell.html.
- [22] LAI, M. et al. Regulation of the behaviors of mesenchymal stem cells by surface nanostructured titanium. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2012, sv. 97, s. 211-220. ISSN 0927-7765.
- [23] DAS, K. et al. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia*, 2007, sv. 3, č. 4, s. 573-585. ISSN 1742-7061.
- [24] KIM, K. et al. Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 2013, sv. 43, č. 4, s. 198-205. ISSN 2093-2278.
- [25] GITTENS, R. A. et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*, 2011, sv. 32, č. 13, s. 3395-3403. ISSN 0142-9612.
- [26] MTT Cell Proliferation Assay. [online]. ATCC, [cit. 6. 3. 2016]. Dostupné z: <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>.
- [27] Cell Proliferation Assay XTT. [online]. AppliChem, [cit. 6. 3. 2016]. Dostupné z: https://www.applichem.com/fileadmin/Application_Notes/Applications_No12_XTT_Cell_Proliferation_150dpi_100915_e.pdf.
- [28] GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, sv. 50, č. 1, s. 63-73. ISSN 0167-7012.
- [29] Alkaline phosphatase activity colorimetric assay kit. [online]. BioVision Incorporated, [cit. 11. 5. 2016]. Dostupné z: <http://www.biovision.com/manuals/K412.pdf?osCsid=vttg2oad7brejn7d8nmag1n736>.
- [30] LIU, X. Y. et al. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science & Engineering R-Reports*, 2004, sv. 47, č. 3-4, s. 49-121. ISSN 0927-796X.
- [31] KULKARNI, M. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for biomedical applications. *Nanomedicine*, 2004, sv. Chapter 5, s. 111-136.
- [32] MAVROGENIS, A. F. et al. Biology of implant osseointegration. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2009, sv. 9, č. 2, s. 61-71. ISSN 1108-7161.
- [33] SPILKOVÁ, K. Zubní implantáty. [online]. [cit. 15. 11. 2015]. Dostupné z: <http://www.zl-spilkova.cz/clanky/zubni-implantaty.html>.
- [34] TŘEŠŇÁK, I. Kost a náhradní kostní materiály v řízení parodontální a kostní regeneraci v implantologii. *StomaTeam* [online]. [cit. 3.4. 2016]. Dostupné z: <http://www.stomateam.cz/cz/kost-a-nahradni-kostni-materialy-v-rizene-parodontalni-a-kostni-regeneraci-v-implantologii/>.
- [35] MIYAUCHI, T. et al. The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photofunctionalized nanoscale TiO₂ layers on biomaterials surfaces. *Biomaterials*, 2010, sv. 31, č. 14, s. 3827-3839. ISSN 0142-9612.
- [36] AITA, H. et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, 2009, sv. 30, č. 6, s. 1015-1025. ISSN 0142-9612.
- [37] AITA, H. et al. Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomaterialia*, 2009, sv. 5, č. 8, s. 3247-3257. ISSN 1742-7061.

- [38] YAO, Z. et al. AAO-assisted synthesis of highly ordered, large-scale TiO₂ nanowire arrays via sputtering and atomic layer deposition. *Nanoscale Research Letters*, 2015, sv. 10. ISSN 1556-276X.
- [39] YAO, B. D. et al. Formation mechanism of TiO₂ nanotubes. *Applied Physics Letters*, 2003, sv. 82, č. 2, s. 281-283. ISSN 0003-6951.
- [40] REGONINI, D. et al. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. *Materials Science & Engineering R-Reports*, 2013, sv. 74, č. 12, s. 377-406. ISSN 0927-796X.
- [41] DRBOHLAVOVA, J. et al. Self-ordered TiO₂ quantum dot array prepared via anodic oxidation. *Nanoscale Research Letters*, 2012, sv. 7. ISSN 1931-7573.
- [42] TSUI, L.-K. et al. Hierarchical decoration of anodic TiO₂ nanorods for enhanced photocatalytic degradation properties. *Electrochimica Acta*, 2015, sv. 155, s. 244-250. ISSN 0013-4686.
- [43] DRBOHLAVOVA, J. et al. Effect of Nucleic Acid and Albumin on Luminescence Properties of Deposited TiO₂ Quantum Dots. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, sv. 7, č. 2, s. 1424-1432. ISSN 1452-3981.
- [44] SJOESTROEM, T. et al. Novel Anodization Technique Using a Block Copolymer Template for Nanopatterning of Titanium Implant Surfaces. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2012, sv. 4, č. 11, s. 6354-6361. ISSN 1944-8244.
- [45] GONG, D. et al. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *Journal of Materials Research*, 2001, sv. 16, č. 12, s. 3331-3334. ISSN 0884-2914.
- [46] PRAKASAM, H. E. et al. A new benchmark for TiO₂ nanotube array growth by anodization. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, sv. 111, č. 20, s. 7235-7241. ISSN 1932-7447.
- [47] SERIKOV, T. M. et al. Synthesis and investigation of the geometric characteristics of titanium dioxide nanotubes. In *International Scientific Conference on Radiation-Thermal Effects and Processes in Inorganic Materials*. 2015, sv. 81.
- [48] APOLINARIO, A. et al. Modeling the Growth Kinetics of Anodic TiO₂ Nanotubes. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2015, sv. 6, č. 5, s. 845-851. ISSN 1948-7185.
- [49] QUIROZ, H. P. et al. Effect of fluoride and water content on the growth of TiO₂ nanotubes synthesized via ethylene glycol with voltage changes during anodizing process. In GOMEZ, M.E. a LOPERA, W. *Workshop on Oxide Materials 2014: Novel Multifunctional Properties*. 2015, sv. 614.
- [50] REGONINI, D. et al. Anodized TiO₂ Nanotubes: Effect of anodizing time on film length, morphology and photoelectrochemical properties. *Materials Letters*, 2015, sv. 142, s. 97-101. ISSN 0167-577X.
- [51] MACAK, J. M. et al. On wafer TiO₂ nanotube-layer formation by anodization of Ti-films on Si. *Chemical Physics Letters*, 2006, sv. 428, č. 4-6, s. 421-425. ISSN 0009-2614.
- [52] KOLSKÁ, Z. Nanomateriály a jejich charakterizace. [online]. [cit. 28.10. 2015]. Dostupné z: <http://umc.ujep.cz/doc/charakterizace_2_prednaska_studentum.pdf>.
- [53] ŠAFÁŘOVÁ, K. Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie. [online]. [cit. 29.10. 2015]. Dostupné z: <http://nanosystemy.upol.cz/download/2009/12-ws/safarova_sem.pdf>.
- [54] NEBESÁŘOVÁ, J. Elektronová mikroskopie pro biology. [online]. [cit. 29.10. 2015]. Dostupné z: <<http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.1.html>>.
- [55] SMITH, K. et al. The scanning electron microscope and its fields of application. *British Journal of Applied Physics*, 1955, sv. 6, č. 11, s. 391-399. ISSN 0022-3727.
- [56] KWOK, D. et al. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1999, sv. 81, č. 3, s. 167-249. ISSN 0001-8686.

- [57] MTT Cell Growth Assay Kit. [online]. Merck millipore, [cit. 4.5. 2016]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/MTT-Cell-Growth-Assay-Kit,MM_NF-CT02#documentation.
- [58] VANDROVCOVA, M. et al. Effect of different surface nanoroughness of titanium dioxide films on the growth of human osteoblast-like MG63 cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, sv. 100A, č. 4, s. 1016-1032. ISSN 1549-3296.
- [59] SJOSTROM, T. et al. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 2009, sv. 5, č. 5, s. 1433-1441. ISSN 1742-7061.
- [60] LEWANDOWSKA, Z. et al. The evaluation of the impact of titania nanotube covers morphology and crystal phase on their biological properties. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2015, sv. 26, č. 4, s. 12. ISSN 0957-4530.

V. SEZNAM PŘÍLOH

<i>Tab. 7: Velikosti pórů u porézních struktur a šířka nanoteček a nanotyčinek.....</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 8: Adheze buněk vyjádřená počtem buněk na plochu 2,37 mm² po 5 hodinách inkubace.....</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 9: Počet adherovaných buněk na 2,37 mm² po 24 hodinách inkubace.....</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 10: Počet adherovaných buněk kulaté morfologie na 2,37 mm² po 24 hodinách inkubace</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 11: Počet adherovaných buněk přepočtených na plochu 1 mm².....</i>	<i>67</i>
<i>Tab. 12: Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační křivky pro MTT test proliferace</i>	<i>67</i>
<i>Tab. 13: Hodnoty kontrolního měření u stanovení aktivity alkalické fosfatázy</i>	<i>67</i>
<i>Tab. 14: Hodnoty absorbance formazanu u MTT testu proliferace a přepočtené hodnoty na počet buněk podle kalibrační křivky.....</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 15: Kalibrační křivka pro stanovení aktivity ALP</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 16: Hodnoty absorbance pNP pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy a přepočet na koncentraci pNP podle kalibrační křivky</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 17: Přepočtené hodnoty koncentrace pNP na aktivitu alkalické fosfatázy</i>	<i>69</i>

Tab. 7: Velikosti pórů u porézních struktur a šířka nanoteček a nanotyčinek

Titan [nm]	1000	napětí [V]	velikost pórů [nm]							průměr	směrodatná odchylka
		1	2	3	4	5	6	7			
		40	62	51	59	49	49	54	57	54	5
		50	61	49	50	46	58	53	49	52	5
	60	64	53	54	48	60	46	45	53	7	
	900	80	61	56	53	47	67	52	48	55	7
		100	56	62	64	50	57	62	58	58	4
		120	59	47	56	55	48	56	53	53	4
	200	40	14	13	17	11	13	16	14	14	2
		50	22	24	19	25	27	19	22	23	3
60		31	33	26	32	33	19	25	28	5	
struktura			šířka [nm]								
nanotečky			44	45	61	52	48	42	52	49	6
nanotyčinky			29	33	32	20	24	31	24	28	5

Tab. 8: Adheze buněk vyjádřená počtem buněk na plochu 2,37 mm² po 5 hodinách inkubace

struktura	počet adorovaných buněk						průměr	směrodatná odchylka
nanotečky	69	111	101	119	151	118	113	20
nanotyčinky	124	144	115	86	111	98	112	27
hladký TiO ₂	72	79					76	4

Tab. 9: Počet adherovaných buněk na 2,37 mm² po 24 hodinách inkubace

struktura	počet adherovaných buněk						průměr	směrodatná odchylka
nanotečky	75	62	114				84	22
nanotyčinky	125	143	98	104	81	89	107	21
hladký TiO ₂	104	94	89	99			97	6

Tab. 10: Počet adherovaných buněk kulaté morfologie na 2,37 mm² po 24 hodinách inkubace

struktura	počet adherovaných buněk						průměr	směrodatná odchylka
nanotečky	46	29	55				43	11
nanotyčinky	40	62	29	23	23	18	33	15
hladký TiO ₂	4	3	1	2			3	1

Tab. 11: Počet adherovaných buněk přepočtených na plochu 1 mm²

čas kultivace	nanotečky		nanotyčinky		hladký TiO ₂	
	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
5 hodin	47	10	48	8	32	2
24 hodin	35	9	45	9	41	2
24 hodin zakulacené	18	5	14	6	1	1

Tab. 12: Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační křivky pro MTT test proliferace

počet buněk/jamku		kontrolní	1 000	5 000	1 0000	50 000	100 000
triplikace	1	0,042	0,015	0,083	0,150	0,432	0,587
	2	0,043	0,023	0,104	0,137	0,496	0,622
	3	0,043	0,035	0,087	0,105	0,496	0,603
průměr		0,043	0,024	0,091	0,131	0,474	0,604
směrodatná odchylka			0,008	0,009	0,019	0,030	0,014

Tab. 13: Hodnoty kontrolního měření u stanovení aktivity alkalické fosfatázy

měření	kalibrační křivka	48 hodin kultivace	72 hodin kultivace
1	0,070	0,069	0,056
2	0,068	0,070	0,057
průměr	0,069	0,070	0,057

Tab. 14: Hodnoty absorbance formazanu u MTT testu proliferace a přepočtené hodnoty na počet buněk podle kalibrační křivky

NANOTEČKY	měření absorbance formazanu					přepočet na koncentraci podle kalibrační křivky	
	kultivace	1	2	průměr	Směrodatná odchylka	průměr	Směrodatná odchylka
	4 hodiny	0,222	0,075	0,148	0,074	21143	10500
	24 hodin	0,639	0,481	0,560	0,080	79929	11285
	48 hodin	0,422	0,418	0,420	0,002	59929	286
	72 hodin	0,232	0,226	0,229	0,003	32643	429
NANOTÝČINKY	měření absorbance formazanu					přepočet na koncentraci podle kalibrační křivky	
	kultivace	1	2	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
	4 hodiny	0,776	0,470	0,623	0,153	88929	21859
	24 hodin	0,317	0,184	0,250	0,067	35714	9500
	48 hodin	0,120	0,334	0,227	0,107	32357	15286
	72 hodin	0,157	-	0,157	-	22357	-
HLADKÝ TiO ₂	měření absorbance formazanu					přepočet na koncentraci podle kalibrační křivky	
	kultivace	1	2	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
	4 hodiny	0,090	-	0,090	-	12786	-
	24 hodin	0,225	0,063	0,144	0,081	20500	11571
	48 hodin	0,140	0,308	0,224	0,084	31929	12000
	72 hodin	0,144	-	0,144	-	20500	-

Tab. 15: Kalibrační křivka pro stanovení aktivity ALP

koncentrace pNP [nmol]		4	8	12	16	20
duplikace	1	0,265	0,562	0,848	1,106	1,362
	2	0,272	0,564	0,842	1,119	1,372
průměr		0,269	0,563	0,845	1,113	1,367
směrodatná odchylka		0,004	0,001	0,003	0,007	0,005

Tab. 16: Hodnoty absorbance pNP pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy a přepočet na koncentraci pNP podle kalibrační křivky

NANTEČKY	měření absorbance					přepočet na koncentraci pNP podle kalibrační křivky	
	kultivace	1	2	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
	48 hodin	0,069	0,077	0,073	0,004	1,050	0,058
	72 hodin	0,064	0,050	0,057	0,007	0,819	0,101
NANOTYČINKY	měření absorbance					přepočet na koncentraci pNP podle kalibrační křivky	
	kultivace	1	2	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
	48 hodin	0,060	0,117	0,088	0,029	0,066	0,021
	72 hodin	0,034	0,052	0,043	0,009	0,032	0,006
HLADKÝ TiO ₂	měření absorbance					přepočet na koncentraci pNP podle kalibrační křivky	
	kultivace	1	2	průměr	směrodatná odchylka	průměr	směrodatná odchylka
	24 hodin	0,014	-	0,014	-	1,275	0,410
	72 hodin	0,046	-	0,046	-	0,659	-

Tab. 17: Přepočtené hodnoty koncentrace pNP na aktivitu alkalické fosfatázy

nanotečky	kultivace	průměr [U/l]	směrodatná odchylka
	48 hodin	0,054	0,003
	72 hodin	0,042	0,005
nanotyčinky	kultivace	průměr [U/l]	směrodatná odchylka
	48 hodin	0,066	0,021
	72 hodin	0,032	0,006
hladký TiO ₂	kultivace	průměr [U/l]	směrodatná odchylka
	48 hodin	0,010	-
	72 hodin	0,034	-